

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-037490

(43)Date of publication of application : 13.02.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 A01H 5/00
 C12N 1/15
 C12N 1/19
 C12N 1/21
 C12N 5/10
 C12N 9/10
 C12P 17/18
 C12P 23/00
 //(C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12N 5/10
 C12R 1:91)

(21)Application number : 2000-151718

(71)Applicant : MITSUI CHEMICALS INC

(22)Date of filing : 23.05.2000

(72)Inventor : MIZUNO MISAKO
 ASHIHARA HIROSHI
 MIZUNO KOICHI
 FUJIMURA TATSUTO

(30)Priority

Priority number : 11146358 Priority date : 26.05.1999 Priority country : JP

(54) GENE ENCODING CAFFEINE SYNTHESIS-RELATED ENZYME AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the new subject gene comprising a nucleotide sequence encoding N-methyltransferase having a specific amino acid sequence, relating to caffeine synthesis and giving a useful enzyme as an enzyme for industrial, food and medical uses.

SOLUTION: A new DNA molecule is disclosed, that has either a nucleotide sequence encoding N-methyltransferase being a polypeptide having an amino acid sequence of the formula and an enzyme activity as 7-methylxanthine N3-methyltransferase, theobromine N1-methyltransferase and paraxanthine N3-methyltransferase or a variant nucleotide sequence obtained by substitution, deletion or insertion of the nucleotide within the range in which a polypeptide encoded by the nucleotide sequence can maintain the enzyme activity to the nucleotide. The DNA is used in efficient production of a caffeine synthesis-related enzyme useful as an enzyme for industrial, food and medical uses. The gene is obtained from a young leaf of tea.

```

Pro Met Arg Asp Glu Gln Gly Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser
      1          18          35
Pro Thr Cys Gly Val Ala Ser Ser His His Thr Ala Leu Asp Cys Cys Ala
      32          49          66
Val Glu Thr Lys Thr Ser Asp Asp Thr His Leu Glu His His Lys Ala Ala
      83          100         117
      :
      :
      :
Leu Met Asp Lys Lys Tyr Ala Lys Thr Thr His Leu Val Val Ser Asp
      134         151         168
Leu Glu Ala Lys Lys Phe Lys Thr Thr Ser His Ser Lys Val Lys Thr
      185         202         219
Lys Thr Asp Lys
      236

```

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The array number of the following nucleotide sequence: (a) array tables : It has the amino acid sequence of 1. The nucleotide sequence which carries out the code of the N-methyltransferase which has the enzyme activity as 7-methyl xanthin N3 methyltransferase, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase, and which is a polypeptide, (b) DNA molecule characterized by having either of the variation nucleotide sequences from which the polypeptide this nucleotide sequence (a) carries out [the polypeptide] a code to the aforementioned nucleotide sequence (a) performed the substitution of a nucleotide, a deletion, or insertion, and was obtained within limits which can maintain the aforementioned enzyme activity.

[Claim 2] The DNA molecule according to claim 1 which is what the aforementioned nucleotide sequence (a) and the aforementioned variation nucleotide sequence (b) can hybridize under stringent conditions.

[Claim 3] The DNA molecule according to claim 1 or 2 which the aforementioned nucleotide sequence (a) becomes from the nucleotide sequence of array number:2 of an array table.

[Claim 4] The array number of the following nucleotide sequence: (a) array tables : It has the amino acid sequence of 1. The nucleotide sequence which carries out the code of the N-methyltransferase which has the enzyme activity as 7-methyl xanthin N3 methyltransferase, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase, and which is a polypeptide, (b) RNA molecule characterized by having either of the variation nucleotide sequences from which the polypeptide this nucleotide sequence (a) carries out [the polypeptide] a code to the aforementioned nucleotide sequence (a) performed the substitution of a nucleotide, a deletion, or insertion, and was obtained within limits which can maintain the aforementioned enzyme activity.

[Claim 5] The RNA molecule according to claim 4 which is what the aforementioned nucleotide sequence (a) and the aforementioned variation nucleotide sequence (b) can hybridize under stringent conditions.

[Claim 6] The RNA molecule according to claim 4 or 5 which the aforementioned array (a) becomes from the nucleotide sequence of array number:3 of an array table.

[Claim 7] The vector for a manifestation characterized by having a DNA molecule according to claim 1 to 3 and the composition for making the aforementioned N-methyltransferase in which the code was carried out by this DNA molecule discover in a plant cell.

[Claim 8] The transformed cell characterized by carrying out the transformation of the host cell by the vector for a manifestation according to claim 7, and being obtained.

[Claim 9] The transformed cell according to claim 8 whose aforementioned host cell is a microbial cell.

[Claim 10] The manufacture method of N-methyltransferase which cultivates a transformed cell according to claim 8 or 9, and has the aforementioned enzyme activity.

[Claim 11] The DNA molecule which is all of the nucleotide sequences which a DNA molecule according to claim 1 to 3 has, or a complementary nucleotide sequence, and is characterized by the ability to check this enzyme activity of this plant cell in part when it is introduced into the

plant cell which has the aforementioned enzyme activity and is discovered.

[Claim 12] The RNA molecule which is all of the nucleotide sequences which an RNA molecule according to claim 4 to 6 has, or a complementary nucleotide sequence, and is characterized by the ability to check this enzyme activity of this plant cell in part when it is introduced into the plant cell which has the aforementioned enzyme activity and is discovered.

[Claim 13] The vector which contains the DNA molecule or RNA molecule of a publication in either [claims 1-6 and] 11-12.

[Claim 14] The vector according to claim 13 which has the function which can be made to discover N-methyltransferase which has the enzyme activity of 7-methyl xanthin N3 methyltransferase, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase within one [at least] cell of a microorganism and vegetation, or checks the manifestation of this N-methyltransferase.

[Claim 15] The microorganism by which the transformation was carried out by the vector according to claim 13 or 14.

[Claim 16] The plant cell, plant tissue, or plant body by which the transformation was carried out by the vector according to claim 13 or 14.

[Claim 17] The plant cell according to claim 16 into which the vector according to claim 13 or 14 was introduced by infection, a plant tissue, or a plant body.

[Claim 18] How to manufacture a vegetable secondary metabolite using a plant cell according to claim 16 or 17, a plant tissue, or a plant body.

[Claim 19] How to change composition of a vegetable secondary metabolite using a plant cell according to claim 16 or 17, a plant tissue, or a plant body.

[Claim 20] How to cultivate a plant cell or a plant tissue according to claim 16 or 17, or to grow a plant body, and to manufacture a vegetable secondary metabolite.

[Claim 21] How to cultivate a plant cell or a plant tissue according to claim 16 or 17, or to grow a plant body, and to change composition of a vegetable secondary metabolite.

[Claim 22] The way according to claim 18 to 21 vegetable secondary metabolites are at least one or more compounds chosen from the group which consists of 7-methyl xanthin, a paraxanthine, a theobromine, and caffeine.

[Claim 23] The way according to claim 18 to 21 a transformation plant body is camellia (Camellia) group vegetation, coffee (Coffea) group vegetation, kola (Cola) group vegetation, holly (Ilex) group vegetation, NEEA (Neea) group vegetation, Chinese parasol tree (Firmiana) group vegetation, PORINIA (Paullinia) group vegetation, or a chocolate tree (Theobroma) group plant body.

[Claim 24] N-methyltransferase characterized by to have the variation amino acid sequence which is N-methyltransferase which has the enzyme activity as 7-methyl xanthin N3 methyltransferase, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase, and was acquired by performing the substitution of the amino acid within the limits which do not spoil the aforementioned enzyme activity at this amino acid sequence to the amino acid sequence of array number:1 of the amino acid sequence of 1 or array number:(b) array table of the (a) array table, insertion, or a deletion

[Claim 25] N-methyltransferase according to claim 25 which is what the nucleotide sequence which carries out the code of the aforementioned amino acid sequence (a), and the nucleotide sequence which carries out the code of the aforementioned variation amino acid sequence (b) can hybridize under stringent conditions.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs] this invention is a caffeine composition system. It is related with the transformed cells by the vector and this vector using N-methyltransferase which has simultaneously three methyltransferase activity, 7-methyl xanthin N3 methyltransferase which is one of the enzymes to constitute, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase, and which is a polypeptide and its variant, the DNA molecule which has the nucleotide sequence which carries out the code of these either or RNA molecules, and these molecules, and these uses.

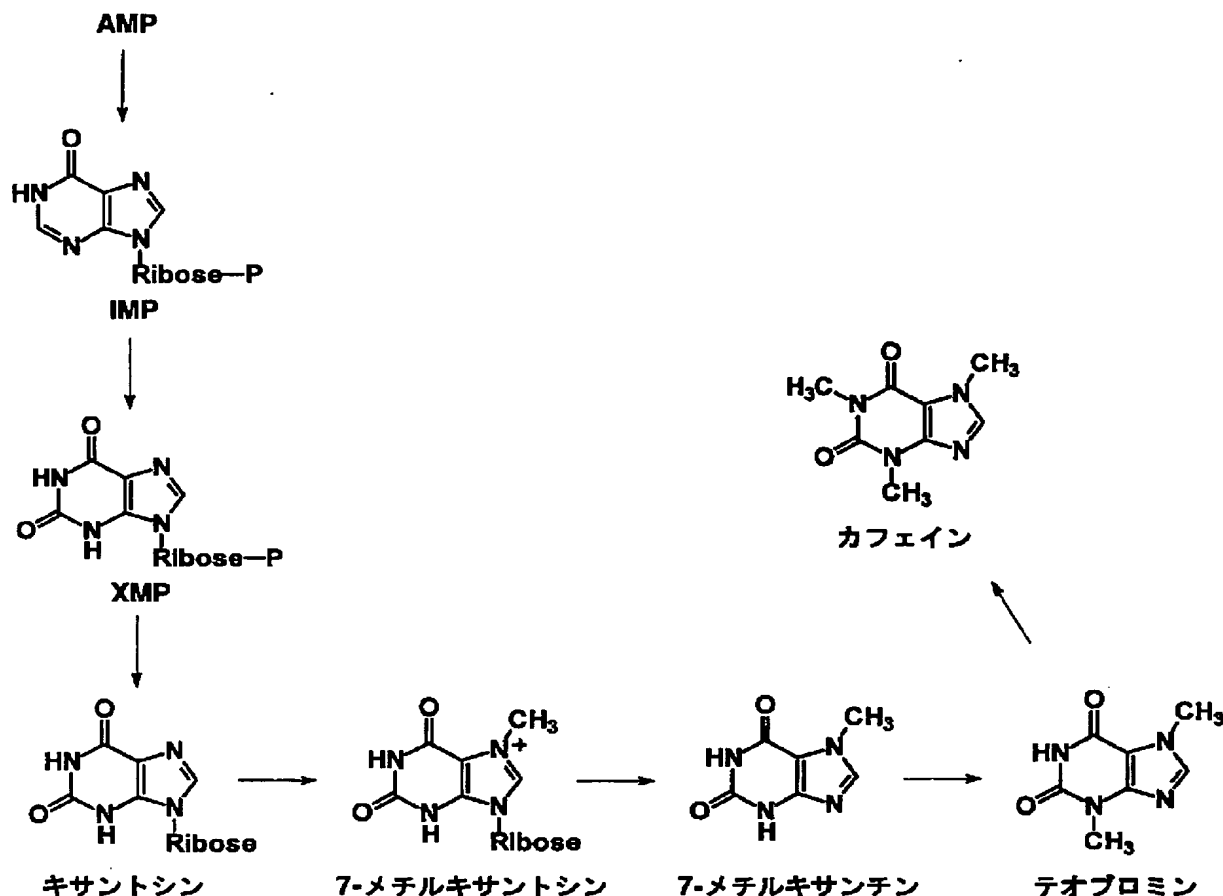
[0002]

[Description of the Prior Art] Caffeine is the purine alkaloid contained in Rubiaceae coffee group vegetation, such as the Theaceae camellia group vegetation, such as tea (*Camellia sinensis*), and coffee (*Coffea arabica*), etc., and is used as a drug raw material or a food additive. Now, caffeine is manufactured by the extraction from caffeine production vegetation including the aforementioned vegetable kind, or organic synthesis. moreover, luxury goods, such as tea and coffee, — setting — stimulative [those] — relief — moreover — or in order to reinforce, the reduction or the increase in the content of caffeine and its intermediate field is tried using the classic breeding technique etc.

[0003] It is shown clearly by the ¹⁴C-tracer experiment at Phytochemistry, 31, and 2575- (1992) that caffeine is biosynthesized through N-methylation of a three-stage from xanthosine. This reaction path is shown below.

[0004]

[Formula 1]



[0005] The enzyme activity which carries out the catalyst of this methylation, i.e., methyltransferase activity, was first reported by the research which used the crude extract of a tea leaf in 1975 (Biochem.J., 146, 87- (1975)). Although refining of a methyltransferase is tried with coffee (Phytochemistry, 37, 1577- (1994)), a refining scale factor is a low very much. In tea, although there is a report of the partial purification of a methyltransferase (Physiol.Plant., 98, 629- (1996)), enzyme protein is not isolated.

[0006] As mentioned above, about DNA which carries out the code of the amino acid sequence of N-methyltransferase which carries out the catalyst of two steps of the methylation reactions of a caffeine composition system enzyme, i.e., 7-methyl xanthin which is the last reaction of the biosynthesis of caffeine, a theobromine - caffeine, and its amino acid sequence, it was not known at all an old place.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The purpose of this invention is to offer DNA which carries out the code of N-methyltransferase which has simultaneously the enzyme activity as 7-methyl xanthin N3 methyltransferase which is one of the enzymes which constitute a useful caffeine composition system in composition of caffeine, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase, and this N-methyltransferase useful to the reinforcement and the suppression of caffeine production in a microorganism or vegetation or an RNA molecule, the vector using it, etc.

[0008] For example, it becomes possible by including all or a part of DNA molecules concerning this invention in a microorganism or a plant cell in the form of a sense or an anti sense to attain the following purposes.

(1) Produce efficiently N-methyltransferase which can be used as industrial use, a food grade, or a medical-application enzyme.

(2) Change the caffeine biosynthesis metabolism of caffeine production vegetation, a plant tissue, or a plant cell, and produce the compound of a caffeine metabolic system efficiently.

(3) Change the caffeine biosynthesis metabolism of caffeine production vegetation, a plant tissue, or a plant cell, and change the generation ratio of the compound group of a caffeine metabolic system.

[0009]

[Means for Solving the Problem] This invention persons analyzed wholeheartedly the N-terminal-amino-acid array of N-methyltransferase as a polypeptide which has simultaneously three enzyme activity, 7-methyl xanthin N3 methyltransferase by which partial purification was carried out from **** of tea, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase, as a result of research. Based on the result, the DNA probe was created and it succeeded in isolating the target DNA molecule by radiographic-PCR method and the 5'RACE method using this probe.

[0010] Next, after including this DNA molecule in a vector, it introduced into Escherichia coli and the polypeptide originating in the DNA molecule concerned was made to discover in large quantities. Generation of the caffeine from the reaction same when the discovered polypeptides are collected and the enzymology-property is investigated as the polypeptide which has three sorts of above-mentioned N-methyltransferase activity separated from **** of tea, i.e., a paraxanthine, was accepted, and it checked having the gene which carries out the code of the N-methyltransferase which has simultaneously the three above-mentioned N-methyltransferase activity which is one of the enzymes with which the DNA molecule concerned constitutes a caffeine composition system.

[0011] If it is the vegetation which performs N-methylation to a xanthosine compound or a xanthins compound by making S-adenosylmethionine (SAM) into a methyl group donor If it is surmised that the polypeptide which has the same enzyme activity as N-methyltransferase or it concerning this invention, and DNA which carries out the code of these further are contained and the method of a publication is used for this invention The same enzyme, the DNA molecule which carries out the code of these further, or an RNA molecule can be substantially obtained with N-methyltransferase or it which starts this invention also from those vegetation.

[0012] This invention persons came to complete this invention based on the above knowledge. That is, each following mode is contained in this invention.

[0013] The array number of the nucleotide sequence:(a) array table of the following [DNA molecule / concerning this invention] : It has the amino acid sequence of 1. The nucleotide sequence which carries out the code of the N-methyltransferase which has the enzyme activity as 7-methyl xanthin N3 methyltransferase, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase, and which is a polypeptide, And it is characterized by having either of the variation nucleotide sequences from which the polypeptide this nucleotide sequence (a) carries out [the polypeptide] a code to the (b) aforementioned nucleotide sequence (a) performed the substitution of a nucleotide, a deletion, or insertion, and was obtained within limits which can maintain the aforementioned enzyme activity.

[0014] What can be hybridized under a nucleotide sequence (a) and stringent conditions as this variation nucleotide sequence (b) is desirable.

[0015] The array number of the nucleotide sequence:(a) array table of the following [molecule / RNA / concerning this invention] : It has the amino acid sequence of 1. The nucleotide sequence which carries out the code of the N-methyltransferase which has the enzyme activity as 7-methyl xanthin N3 methyltransferase, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase, and which is a polypeptide, And it is characterized by having either of the variation nucleotide sequences from which the polypeptide this nucleotide sequence (a) carries out [the polypeptide] a code to the (b) aforementioned nucleotide sequence (a) performed the substitution of a nucleotide, a deletion, or insertion, and was obtained within limits which can maintain the aforementioned enzyme activity.

[0016] What can be hybridized under a nucleotide sequence (a) and stringent conditions as this variation nucleotide sequence (b) is desirable.

[0017] The vector for N-methyltransferase manifestation concerning this invention is characterized by having the above-mentioned DNA molecule and the composition for making N-methyltransferase in which the code was carried out by this DNA molecule discover in a plant

cell. A transformed cell can be obtained by carrying out the transformation of the host cell using this vector for a manifestation. Furthermore, this transformed cell can be cultivated and N-methyltransferase which has the aforementioned enzyme activity can be manufactured.

[0018] In part, other modes of the DNA molecule concerning this invention are all of the nucleotide sequences which the above-mentioned DNA molecule has, or a complementary nucleotide sequence, and when it is introduced into the plant cell which has the aforementioned enzyme activity and is discovered, they are characterized by the ability to check this enzyme activity of this plant cell.

[0019] Other modes of the RNA molecule concerning this invention are all or the arrays complementary in part of nucleotide sequences which the above-mentioned RNA molecule has, and when it is introduced into the plant cell which has the aforementioned enzyme activity and is discovered, they are characterized by the ability to check this enzyme activity of this plant cell.

[0020] One mode of the vector concerning this invention is characterized by including either the above-mentioned DNA molecule and an RNA molecule. This vector can be offered as what has the function which can be made to discover N-methyltransferase which has the enzyme activity of 7-methyl xanthin N3 methyltransferase, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase within the cell of a microorganism and/or vegetation, or checks the manifestation of this N-methyltransferase. Using this vector, the transformation of a microorganism, a plant cell, a plant tissue, or the plant body can be carried out, and the obtained transformant is also contained in this invention. A vegetable secondary metabolite can be made to manufacture using the transformant of this plant cell, a plant tissue, or a plant body.

Moreover, composition of a vegetable secondary metabolite is changeable using this plant cell, a plant tissue, or a plant body.

[0021] N-methyltransferase concerning this invention is a polypeptide which has the enzyme activity as 7-methyl xanthin N3 methyltransferase, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase, and is characterized by to have the variation amino acid sequence acquired by performing the substitution of the amino acid within the limits which do not spoil the aforementioned enzyme activity at this amino acid sequence to the amino acid sequence of array number:1 of the amino acid sequence of 1 or the array number:(b) array table of the (a) array table, insertion, or a deletion

[0022] What can be hybridized as this variation amino acid sequence (b) under conditions with stringent DNA which carries out the code of the amino acid sequence (a) and DNA which carries out the code of this variation amino acid sequence (b) is desirable.

[0023] According to this invention, the DNA molecule and RNA molecule which carry out the code of the N-methyltransferase which has simultaneously the enzyme activity as 7-methyl xanthin N3 methyltransferase which is one of the enzymes which constitute a useful caffeine composition system, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase, and which is a polypeptide to the alteration of composition of caffeine and composition of the caffeine produced in a microorganism or vegetation etc. are offered.

[0024]

[Embodiments of the Invention] N-methyltransferase concerning this invention is a polypeptide which has simultaneously the enzyme activity as 7-methyl xanthin N3 methyltransferase, theobromine N1 methyltransferase, and paraxanthine N3 methyltransferase.

[0025] What has the amino acid sequence shown in array number:1 as this N-methyltransferase, an array number: It is the range which does not spoil N-methyltransferase activity considered as a request to the amino acid sequence of 1, and what has the variation amino acid sequence acquired by performing the substitution of amino acid, insertion, or a deletion can be mentioned. Namely, the array number which has the above-mentioned N-methyltransferase activity considered as a request: Name N-methyltransferase the polypeptide which has the amino acid sequence and its variation array of 1 generically.

[0026] What itself has a function equivalent to N-methyltransferase of tea **** substantially, and has the high homology as a polypeptide which has the above-mentioned variation amino acid sequence in the part in connection with the amino acid sequence and enzyme activity of array number:1 can be mentioned.

[0027] It is known well that the homology of amino acid sequences other than a part indispensable to enzyme activity is sometimes very low among two or more enzymes which generally have an equivalent function (Kawagoe et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93, 12082- (1996)). Therefore, even when the homology as the whole is low, what has a high homology in the part in connection with activity can be classified as an N-methyltransferase concerning this invention.

[0028] As a variation amino acid sequence at the time of comparing as the whole amino acid sequence array number: -- the amino acid sequence of 1 -- receiving -- 15% or more of homology -- desirable -- 30% or more of homology -- more -- desirable -- 45% or more of homology -- further -- desirable -- 60% or more of homology -- 75% or more of homology and the variation amino acid sequence which can offer 90% or more of homology and the polypeptide which has 95% or more of homology most preferably, and has desired N-methyltransferase activity further more much more preferably can be mentioned further more preferably.

[0029] In addition, an array number : When the variation on the basis of the amino acid sequence of 1 is expressed on the level of the nucleotide sequence which carries out the code of these, As a variation nucleotide sequence which carries out the code of the variation amino acid sequence Array number : As opposed to the nucleotide sequence which carries out the code of the amino acid sequence of 1 35% or more of homology -- desirable -- 60% or more of homology -- more -- desirable -- 75% or more of homology -- 90% or more of homology and the variation nucleotide sequence which has 95% or more of homology still more preferably can be mentioned still more preferably

[0030] the nucleotide sequence which carries out the code of the amino acid sequence of array number:1 as the nucleotide sequence which carries out the code of the N-methyltransferase concerning this invention, i.e., an N-methyltransferase gene, -- it can mention -- the example -- carrying out -- the DNA array of array number:2 and the RNA array of array number:3 can be mentioned The nucleotide sequence which has the homology specified above is also contained in a code gene in N-methyltransferase in this invention to these N-methyltransferase genes.

[0031] as a variation amino acid sequence which maintained N-methyltransferase activity considered as a request, what the variation nucleotide sequence which carries out the code of this variation amino acid sequence, and the nucleotide sequence which carries out the code of the amino acid sequence of array number:1 can hybridize under stringent conditions is suitable-alike practically, and can use

[0032] moreover, the nucleotide sequence which carries out the code of the amino acid sequence of array number:1 also as a variation N-methyltransferase gene, and the thing which can be hybridized under stringent conditions are suitable-alike practically, and can use A DNA molecule and array number which can be hybridized under stringent conditions to the nucleotide sequence of array number:2 as the example: The RNA molecule which can be hybridized under stringent conditions can be mentioned to the nucleotide sequence of 3.

[0033] The hybridization under these stringent conditions is Molecular Cloning. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Current Protocols inMolecular Biology; It can carry out to Wiley Interscience by the method of a publication, and a GeneImage system (Amersham) can be mentioned as a commercial system. Specifically, the following operations can perform hybridization.

[0034] It is made to hybridize in the probe which carried out the indicator of the film which imprinted DAN or the RNA molecule which should be examined according to the product protocol, and the hybridization buffer of protocol specification. Composition of a hybridization buffer consists of 0.1-% of the weight SDS, 5-% of the weight dextran sulfate, a blocking reagent of kit appending of 1 / 20 **, and 2 - 7xSSC. As a blocking reagent, it is 100xDenhardt's, for example. solution, 2%(weight/capacity) Bovine serum albumin2% (a weight/capacity) FicllTM400 and the thing which prepared the polyvinyl pyrrolidone by 5 ***** 2% (a weight/capacity) can be diluted and used for 1/20. 20xSSC -- 3M sodium chloride and a 0.3M citric-acid solution -- it is -- SSC -- more -- desirable -- 3 - 6xSSC -- it is used by the concentration of 4 - 5xSSC still more preferably

[0035] 40-80 degrees C, more preferably, the range of the temperature of hybridization is 55-65

degrees C, and 50–70 degrees C, still more preferably, after it performs an overnight incubation from several hours, a washing buffer washes it. the temperature of washing — desirable — a room temperature — it is the temperature at the time of hybridization more preferably composition of a washing buffer — a 6xSSC+ 0.1-% of the weight SDS solution — more — desirable — a 4xSSC+ 0.1-% of the weight SDS solution — further — desirable — a 2xSSC+ 0.1-% of the weight SDS solution — further — desirable — a 1xSSC+ 0.1-% of the weight SDS solution — it is a 0.1xSSC+ 0.1-% of the weight SDS solution most preferably Such a washing buffer can wash a film and the DNA molecule or RNA molecule which the probe hybridized can be discriminated using the indicator used for the probe.

[0036] In addition, what was produced in the nature may be used for variation, and what was artificially started by the site specific mutagenesis in a nucleotide sequence may be used for it.

[0037] The DNA molecule which has N-methyltransferase gene of this invention is separable from the cell which produces N-methyltransferase concerning this invention using the PCR technology (vegetable PCR experiment protocol (cell technology separate volume, plant cell engineering series 2) Shujunsha (1995)) using the oligonucleotide specifically hybridized to the DNA molecule which carries out the code for example, of the N-methyltransferase as a primer.

[0038] The overall-length array of the purpose cDNA can be isolated by specifically combining a linker with cDNA compounded from mRNA, and performing PCR between DNA which carries out the code of the amino acid sequence which constitutes N-methyltransferase, and a linker etc.

[0039] the DNA molecule which carries out the code of the N-methyltransferase obtained by such hybridization technology or PCR technology has N-methyltransferase gene of a publication, and a homology in array number:2 in the part used for isolation at least comparison of an amino acid sequence in which each N-methyltransferase gene carries out a code to a homology here — — setting — 15% or more of homology — desirable — 30% or more of homology — more — desirable — 45% or more of homology — further — desirable — 60% or more of homology — further — more — desirable — 75% or more of homology — further — more — much more — desirable — 90% or more of homology — 95% or more of homology is pointed out most preferably However, as a deletion and a result added and replaced, two or more residues of the amino acid which carries out a code depending on N-methyltransferase gene obtained hold a field indispensable to the function of N-methyltransferase in addition, even if a homology with N-methyltransferase becomes 15% or less, and carrying out the code of the protein which has a function equivalent to N-methyltransferase substantially is also assumed.

[0040] Although all can be used if it is the organism which produces caffeine or its precursor as an organism used in order to isolate the DNA molecule which has the nucleotide sequence (gene) which carries out the code of the N-methyltransferase concerning this invention, or an RNA molecule, the Sterculiaceae kola (Cola) group vegetation, such as Rubiaceae coffee (Coffea) group vegetation, such as the Theaceae camellia (Camellia) group vegetation, such as tea, and coffee, and a kola, etc. can be illustrated especially.

[0041] It is the sense of a request of the N-methyltransferase DNA obtained by the above-mentioned method, and the RNA molecule which has N-methyltransferase gene concerning this invention is connected and rearranged in the position which may function, prepares a molecule, and this can be made to be able to translate into a promotor's lower stream of a river which RNA polymerase, such as Sp6 promotor and T7 promotor, recognizes by RNA polymerase, such as Sp6 RNA polymerase and T7 RNA polymerase, and it can obtain it on it. Moreover, it can connect and rearrange in the position which may function on a suitable DNA manifestation cassette as introducing the N-methyltransferases DNA and RNA into a plant virus, or stating later with the sense of a request of the N-methyltransferase DNA, a molecule can be formed, and it can also obtain by introducing this recombination molecule into hosts, such as a microorganism and vegetation, using a host's transcriptional activity.

[0042] It is the DNA molecule which has all or the part, and the complementarity of the DNA molecules which have N-methyltransferase gene, or the RNA molecule which has all or the part, and the complementarity of the RNA molecules which have N-methyltransferase gene, and what has the function which checks the manifestation of N-methyltransferase in a host cell when discovered in the host cell which produces caffeine or its precursor can use as the DNA

molecule or the RNA molecule prevention of N-methyltransferase manifestation in a host cell, or for suppression.

[0043] Here, a part of N-methyltransferase gene is the portion from which it combines with mRNA for this making N-methyltransferase in a host cell discover, and the manifestation of N-methyltransferase in a host cell is prevented, when mRNA for prevention obtained on the basis of the array which has a complementarity into the portion, i.e., an antisense RNA, is formed in a host cell. As this portion, it is the portion which is needed for formation of such an anti sense mRNA, for example, the portion of the length of 14 base length can be mentioned at least.

[0044] As a DNA molecule for anti sense mRNA formation, the DNA molecule which has all or part, and complementarity of nucleotide sequences of array number:2 can be mentioned, for example, and the RNA molecule which has all or part, and complementarity of nucleotide sequences of array number:3 can be mentioned as an antisense RNA molecule. The DNA molecule which has all or part, and complementarity of these nucleotide sequences and the variation arrays which can be hybridized under stringent conditions, or an RNA molecule can also be used for such a purpose.

[0045] In addition, to the DNA molecule or RNA molecule for these prevention, it has a high homology and what can demonstrate the prevention or suppression function considered as a request can be used. a homology high here — comparison of each nucleotide sequence — setting — 60% or more of homology — desirable — 75% or more of homology — further — desirable — 90% or more of homology — 95% or more of homology is pointed out most preferably

[0046] The DNA molecule or the RNA molecule itself for these prevention may not necessarily carry out the code of the N-methyltransferase concerning this invention.

[0047] Although it has N-methyltransferase gene and the portion which has a homology as other modes of the nucleotide sequence for N-methyltransferase prevention concerning this invention, it is the nucleotide sequence which has not carried out the code of the N-methyltransferase, and what may vanish a host's N-methyltransferase activity can be mentioned in being replaced by N-methyltransferase gene which a host cell has.

[0048] The example which used the plant cell as a host cell about the manifestation within the host cell of the DNA molecule which has the function which checks or suppresses the manifestation of these N-methyltransferase gene or N-methyltransferase is explained below.

[0049] The promotor to whom the manifestation by the plant cell enables the imprint to mRNA within the (i) host cell from DNA, (ii) The DNA fragment containing N-methyltransferase gene connected with a promotor's lower stream of a river in the sense direction or the anti sense direction, Or the DNA fragment which has the function which checks the manifestation of N-methyltransferase, (iii) A manifestation cassette including the terminator array containing a polyadenylation region required for stabilization of the transcript connected with the lower stream of a river of these DNA fragments if needed etc. is introduced into the plant cell which is a host, and the method of carrying out the transformation of this can be used.

[0050] Such a manifestation cassette and the vector containing this are also the objects of this invention.

[0051] A manifestation cassette may contain the promotor for making DNA inserted discover constantly or in guidance. Moreover, this manifestation cassette. It can have a duplicate origin for a duplicate within a plant cell if needed.

[0052] As a promotor for making it discovered constantly, 35S promotor of a cauliflower mosaic virus, the actin promotor of a rice, etc. are mentioned, for example. Moreover, the promotor by whom it is known as a promotor for making it discovered in guidance that it will be discovered with external causes, such as spraying of mold, bacteria, infection of a virus and an invasion, low temperature, an elevated temperature, dryness, an anaerobic condition, and a specific compound, for example is mentioned. As such a promotor, the promotor of mold, bacteria, and the chitinase gene of a rice discovered by infection and an invasion of a virus, the promotor of PR protein gene of tobacco, the promotor of the "lip19" gene of the rice guided by low temperature, the promotor of the "HSP18.2" gene of the thale-cress guided with an elevated temperature, the promotor of the "rab" gene of the rice guided by dryness, the promotor of the alcohol-

dehydrogenase gene of the zea guided by the anaerobic condition, Moreover, the "rab" gene promotor of a rice is guided by spraying of the abscisic acid of plant hormone with the compound of specification [the promotor of the chitinase gene of a rice, and the promotor of PR protein gene of tobacco], such as a salicylic acid.

[0053] Or the method of isolating and using the promotor of N-methyltransferase gene as a promotor for making DNA inserted in the manifestation cassette discover again is also mentioned.

[0054] By use of the hybridization technology which used all or a part of N-methyltransferase genes as the probe, a genomic DNA fragment can be chosen as an example of a promotor's concrete isolation method, and the method of specifying the upper section DNA of this gene can be mentioned as it.

[0055] In order to prepare for the introduction to the vegetation of the recombinant DNA molecule in a manifestation cassette, many cloning vectors containing the marker gene for selecting the duplicate signal of Escherichia coli and the bacterial cell by which the transformation was carried out can use. There are a pBR322 and pUC system, an M13mp system, etc. in the example of such a vector. The array of the purpose can be introduced into a vector by the suitable restriction enzyme cleavage site. In order to clarify the feature of the obtained plasmid DNA, generally restriction enzyme cleavage site analysis, gel electrophoresis, and the other biochemical-molecular biology-methods are used. After finishing each operation, plasmid DNA can be cut and it can be made to combine with another DNA. Cloning of the array of each plasmid DNA can be carried out into the same plasmid or another plasmid.

[0056] Various technique can be used in order to introduce a manifestation cassette into a plant cell. In such technique, they are an Agrobacterium tumefaciens (Agrobacterium tumefaciens) or an Agrobacterium as a transforming principle. The possibility of the transformation of a plant cell, the direct introduction (the injection method, the electroporation method, etc.) to a protoplast, the party Kurgan method, etc. and others by T-DNA using RIZOGENESU (Agrobacterium rhizogenes) is contained.

[0057] There is no vector specially needed in the direct introduction to a protoplast. For example, a simple plasmid like a pUC derivative can be used. Depending on the method of introducing the target gene into a plant cell, other DNA arrays may be needed. For example, when using Ti or a Ri plasmid for the transformation of a plant cell, it is desirable a right end array and to connect [of Ti and the T-DNA field of a Ri plasmid] the array of ***** mostly, so that it may become the adjoining field of the gene which should be introduced at least.

[0058] When using the Agrobacterium bacillus for a transformation, it is necessary to carry out cloning of the manifestation cassette which should be introduced into a special plasmid, i.e., a middle vector, or a binary vector. A middle vector is not reproduced in the Agrobacterium bacillus. A middle vector shifts into the Agrobacterium bacillus by the helper plasmid or electroporation. Since a middle vector has the array of T-DNA, and a homology field, it is incorporated by homology recombination in Ti of the Agrobacterium bacillus, or a Ri plasmid. The vir field needs to be included in the Agrobacterium bacillus used as a host. Usually, the vir field is included in Ti or the Ri plasmid, and T-DNA can be made to shift to a plant cell by the work.

[0059] On the other hand, if incorporated in the Agrobacterium bacillus by the helper plasmid or the electroporation method, T-DNA on a binary vector can be made to shift to a plant cell by work of a host's vir field, since a binary vector is reproduced and may be maintained in the Agrobacterium bacillus.

[0060] In addition, microorganisms, such as a middle vector containing the manifestation cassette obtained by doing in this way or a binary vector, and Escherichia coli containing this, the Agrobacterium bacillus, are also the objects of this invention.

[0061] The plant cell by which the transformation was carried out is convertible for a plant tissue or a plant body by passing through a renewal process. Although the reproductive method changes with kinds of plant cell, for example with a rice, Akama's and others method (Plant Cell Rep., 12, 7- (1992)) etc. is mentioned by Shillito's and others (Bio/Technology, 7, 581- (1989)) method, and thale-cress by Fujimura's and others (Plant Tissue Culture Lett., 2, 74- (1995)) method, and corn.

[0062] In this invention, a "plant body" points out the whole bion classified into vegetation, or some organs (for example, a leaf, a stalk, a root, a flower, fruits, a seed, etc.).

[0063] As compared with the plant body of the wild type to which the plant body obtained from the plant body made by these methods or its propagation media (for example, a seed, a tuber, ****, etc.) produces caffeine or its precursor, the amount of manifestations of N-methyltransferase of this invention changes, and change of the amount of generation of the caffeine metabolic system compound by the alteration of the metabolism of host vegetation and change of the generation ratio of the caffeine metabolic system compound group by the alteration of the metabolism of host vegetation take place. Thus, the obtained transgenic plant is the object of this invention. A vegetable specific organization or vegetable specific cells, such as a leaf, a flower, fruits, and a seed, are also contained in the vegetation as used in the field of this invention.

[0064] moreover, recent years -- a vegetable post transformer rhe -- it has turned out that it is possible to suppress the purpose gene expression from research of SHONARU gene siren SHINGU using the defense machine term with which vegetation is originally equipped to visitor nucleic acids, such as a virus, (Cell, 95,177-187 (1998), chemistry and an organism, 37,532- (1999), a protein nucleic-acid enzyme, 44, 1396- (1999)) According to this, when a DNA virus, an RNA virus, etc. advance into vegetation, vegetation imprints average RANTO RNA from such mold, and forms double stranded RNA in the transcript and array unique target of an array which vegetation originally has. This double stranded RNA becomes possible [suppressing the target gene expression], when decomposed by RNase (Cell, 96, 303- (1999)). One of the important features of this method is in the point that it is not necessary to necessarily carry out the transformation of the array which wants to suppress a manifestation to the purpose vegetation. Moreover, the further feature of this method will be that the effect spreads in the whole plant body, if the target nucleic acid is introduced into vegetable [some] (low rank leaf etc.) by infection etc. The concrete manifestation suppression method infects double stranded RNA including all or a part of arrays with the array of the purpose gene or it, and a high homology, and an Agrobacterium with double stranded DNA with a vegetable low rank leaf. a homology high here -- comparison of each base sequence -- setting -- 60% or more of homology -- desirable -- 75% or more of homology -- further -- desirable -- 90% or more of homology -- 95% or more of homology is pointed out most preferably

[0065] As compared with the plant body of the wild type to which the plant body to which this method was given produces caffeine or its precursor, the amount of manifestations of N-methyltransferase protein of this invention changes, and change of the amount of generation of the caffeine metabolic system compound by the alteration of the metabolism of host vegetation and change of the generation ratio of the caffeine metabolic system compound group by the alteration of the metabolism of host vegetation take place. Thus, the obtained vegetation is the object of this invention. A vegetable specific organization or vegetable specific cells, such as a leaf, a flower, fruits, and a seed, are also contained in the vegetation as used in the field of this invention.

[0066] As vegetation which generates caffeine by making the aforementioned SAM into a methyl group donor, caffeine production vegetation, such as the Sterculiaceae kola (Cola) group vegetation, such as Rubiaceae coffee (Coffea) group vegetation, such as the Theaceae camellia (Camellia) group vegetation, such as tea, and coffee, and a kola, can be illustrated.

[0067] As a microorganism for introducing DNA which carries out the code of the N-methyltransferase concerning this invention, and making N-methyltransferase protein discover in large quantities, viruses, such as bacteria, such as Escherichia coli and a Bacillus subtilis, and a baculovirus, can be illustrated.

[0068] Moreover, all can be used if it is the vegetation which produces caffeine or its precursor as vegetation for incorporating DNA which carries out the code of the N-methyltransferase concerning this invention in the form of a sense or an anti sense for the purpose of changing the metabolism of a host cell and aiming at the improvement in productivity of a specific compound, and the generation ratio alteration of a specific compound group, and obtaining transformation vegetation.

[0069] growing the plant body by which cultivated the plant cell or plant tissue by which the transformation was carried out by the vector of the above-mentioned composition, or the transformation was carried out similarly, and changing composition of the secondary metabolite produced by manufactures and these transformants of the secondary metabolite concerning a caffeine composition system cuts At least one or more compounds chosen from the group which consists of 7-methyl xanthin, a paraxanthine, a theobromine, and caffeine as this secondary metabolite, for example can be mentioned.

[0070] As the plant cell used for a transformation, a plant tissue, or a supply field of a plant body, camellia (*Camellia*) group vegetation and coffee (*Coffea*) group vegetable ** can mention [a nature conversion plant body] kola (*Cola*) group vegetation, holly (*Ilex*) group vegetation, NEEA (*Neea*) group vegetation, Chinese parasol tree (*Firmiana*) group vegetation, PORINIA (*Paullinia*) group vegetation, or chocolate tree (*Theobroma*) group vegetation, for example.

[0071] The Sterculiaceae kola (*Cola*) group vegetation, such as Rubiaceae coffee (*Coffea*) group vegetation, such as the Theaceae camellia (*Camellia*) group vegetation, such as tea, and coffee, and a kola, etc. can be illustrated as a desirable thing especially.

[0072] Furthermore, since N-methyltransferase concerning this invention can methylate structure analogue called 7-methyl xanthin besides a theobromine, if it is the vegetation containing the structure analogue of these xanthins even if it is except the aforementioned vegetable kind, it can apply the method of this invention.

[0073] In addition, it is clear that N-methyltransferase concerning this invention has the following fundamental properties as a result of enzymology-examination.

Molecular weight : 41,000 (SDS-PAGE) 61,000 (gel filtration)

Isoelectric point: 4.5-5.0 (chromatofocusing)

optimum pH: — 8.5km value: — 21microM (SAM) and 24microM (paraxanthine)

Inhibitor: SAH (S-adenosyl homocysteine)

Reaction mechanism: SAM+ paraxanthine → SAH+ caffeine. [0074]

[Example] Hereafter, although an example and the example of comparison explain this invention still more concretely, the range of this invention is not limited to these examples.

[0075] The 1st, 2, and 3 leaf of the tea leaf (*Camellia sinensis* var. Yabukita) whose seeds were gathered in Makurazaki-shi, Kagoshima was frozen in manufacture May, 1997 of 1N-methyltransferase refining fraction of examples using liquid nitrogen, and it saved at -80 degrees C. In 100g of this material, they are 1,000ml 5mM(s). EDTA-Na2, a 5mM2-mercaptoethanol, 5% (v/v) A glycerol, 1mg The aprotinin, 0.5% (w/v) A sodium ascorbate, 50mM(s) which contain an insoluble polyvinyl poly pyrrolidone 2.5% (w/v) Add and grind the sodium phosphate buffer solution (pH 7.3), and carry out centrifugal separation (10,000g, 15 minutes) of the filtrate after filtering with the gauze of three layers. The supernatant liquid was obtained. It is 50-80% to this supernatant liquid. Saturated-ammonium-sulfate fractionation was prepared. This fractionation. Sephadex It desalts using G-25 and is 2mM. EDTA-Na2, 2mM 2-mercaptoethanol, 20% (v/v) 10mM(s) containing a glycerol After making it dissolve in the sodium phosphate buffer solution (pH 7.2) It is made to stick to the hydroxyapatite column (15x160mm) which equilibrated with the same buffer solution. 200ml 2mM EDTA-Na2, 2mM 2-mercaptoethanol, 20% (v/v) The activity fraction was eluted using the linear density gradient of the 10-200mM sodium phosphate buffer solution containing a glycerol. Activity fractions are collected and it is 80%. Saturated-ammonium-sulfate processing recovers precipitation and it is 2mM. EDTA-Na2, 2mM 2-mercaptoethanol, 20mM KCl, 50mM(s) which contain a glycerol 20% (v/v) It dissolved in the tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 8.4). Anion-exchange column Shodex only for high performance chromatographies which equilibrated with the same buffer solution after performing desalting processing IEC It was made to stick to QA-824 (8x25mm). It is 36ml [after washing a column] 20-750mM with the same buffer solution. Adsorption protein was eluted in the linear density gradient of KCl (it dissolves in the 50mM(s) tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 8.5) containing 2mM EDTA-Na2, a 2mM 2-mercaptoethanol, and 20%(v/v) glycerol). Activity fractions are collected, desalting processing is performed and it is 2mM. EDTA-Na2, 2mM 2-mercaptoethanol, 20% (v/v) 50mM(s) containing a glycerol After dissolving in the tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 8.5), it was made to stick to the adenosine-agarose (1ml)

which is the affinity column which equilibrated with the same buffer solution. 0.2M NaCl, 2mM EDTA-Na₂, 2mM 2-mercaptoethanol, 20% (v/v) 50mM(s) containing a glycerol The activity fraction was eluted with the tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 8.5). They are 2mM(s) about the obtained fraction. 2-mercaptoethanol, 150mM KCl, 20% (v/v) 50mM(s) containing a glycerol HiLoad which equilibrated with the tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 8.5) Superdex Gel filtration was performed using 200 (16x600mm), and the last refining preparation was obtained. Change of the specific activity in the refining process of N-methyltransferase was summarized in Table 1.

[0076]

[Table 1]

表 1

ステップ	画分	液量 (ml)	総活性 (pkat)	総タンパク質量 (mg)	比活性 (pKat/mg)	精製度 (倍)	産生量 (%)
1	粗抽出物	930	6330	581	10.9	1.0	100
2	硫酸アンモニウム	33.8	3410	155	22.0	2.0	53.9
3	ヒドロキシアパタイト	23.0	2630	28.9	91.0	8.0	41.5
4	Shodex IEC QA-824	7.5	1070	4.82	221	20.3	16.9
5	アデノシン-アガロース	2.0	202	0.08	2530	232	3.2
6	Superdex 200	5.8	228	0.04	5700	523	3.6

[0077] The analysis last refining preparation of the amino-terminus amino acid sequence of 2N-methyltransferase refining fraction of examples was imprinted to the PVDF membrane after SDS polyacrylamide gel electrophoresis using semi dry blotting equipment. The part by which N-methyltransferase was imprinted was cut off and the amino acid sequence of an amino terminus was analyzed using the ABI protein sequencer. the result -- array number: -- it is shown in 4 [0078] Oligonucleotide NMT-1 and NotI-(dT)18 primer (Pharmacia biotechnology tech) of 19 residues based on 7 amino acid residues of the oligonucleotide amino terminus for cDNA cloning of 3N-methyltransferase of examples was used as the probe. Array number: The array of NMT-1 is shown in 5.

[0079] Composition total of the 1 chain cDNA for cloning of 4N-methyltransferase gene of examples (1) The young tea leaf of 5g of isolation of RNA was crushed using the pestle and the mortar under liquid nitrogen existence. 3M (after sublimation of liquid nitrogen, and 50ml) LiCl, 8M The urea was added and it crushed further by the poly TRON. After putting at 4 degrees C overnight, centrifugal separation was performed for 15 minutes by 12,000rpm. It is precipitation 0.5% SDS, 10mM Tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 7.6) It suspended and was made about 10ml in the total amount. 10ml the phenol / chloroform solution were added, it mixed, and 12,000rpm and centrifugal separation for 10 minutes were performed. It is 3M of 1/10 time ** to a supernatant liquid. The sodium acetate solution (pH 4.8) was added, the ethanol of double-precision ** was added further, and it put at -80 degrees C for 1 hour. It is 70% to the precipitation which performed 4 degrees C, 12,000rpm, and centrifugal separation for 10 minutes, and removed the supernatant liquid. Ethanol was added and suspended and centrifugal separation was performed again. The supernatant liquid was removed and the dry rise was carried out with the vacuum pump. Precipitation is melted in 1.5ml water and it is 3M of 150microl. The sodium acetate solution (pH 4.8) was added, 1.5 moreml the phenol / chloroform solution were added, fall mixing was carried out, and 12,000rpm and centrifugal separation for 10 minutes were performed. It is 70% to the precipitation which may have had 12,000rpm and the centrifugal separation for 10 minutes performed at 4 degrees C after adding the ethanol of double-precision ** to the supernatant liquid and putting for 20 minutes at -80 degrees C. Ethanol was added and centrifugal separation was performed again. Precipitation is melted in 1.5ml water and it is 3M of 150microl. The sodium acetate solution (pH 4.8) was added, 1.5 moreml the phenol / chloroform solution were added, fall mixing was carried out, and 12,000rpm and centrifugal separation for 10 minutes were performed. It is 70% to the precipitation which may have had 12,000rpm and the centrifugal separation for 10 minutes performed at 4 degrees C after adding the ethanol of

double-precision ** to the supernatant liquid and putting for 20 minutes at -80 degrees C. Ethanol was added and centrifugal separation was performed again. After carrying out a dry rise with a vacuum pump, it dissolves in the water of 200microl, and it is total. It considered as the fraction of RNA.

[0080] (2) total obtained by the isolation above-mentioned method of mRNA It mixed with equivalent double-precision concentration A liquid (the 10 mM Tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 7.5), 1mM EDTA-Na2, 0.1% SDS, 0.5M NaCl), after performing 65 degrees C and heat treatment for 5 minutes to RNA (2mg). 0. oligo(dT)-Cellulose of 1 g Type7 (Pharmacia) is made to swell in 2ml B liquid (the 10mM Tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 7.5), 1mM EDTA-Na2, 0.1% SDS, 0.1M NaCl), the blue chip which packed glass wool at the nose of cam is filled with the suspension, and it is 0.1Ns of 2.5 ml. After washing by NaOH, 5ml A liquid was poured and equilibrated. It is total to this column. After applying RNA and pouring 3ml A liquid and 4ml B liquid, mRNA was eluted with 3ml C liquid (the 10mM Tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 7.5), 1mM EDTA-Na2, 0.05% SDS). After condensing and carrying out the dry rise of the eluate by ethanol precipitation, it dissolved in water, and it saved at -80 degrees C.

[0081] (3) mRNA of synthetic 190ng of the 1 chain cDNA was quenched for 3 minutes in Hikami, immediately after performing 65 degrees C and heat treatment for 10 minutes. This sample is made into a template and it is First-Strand. cDNA Synthesis The 1 chain cDNA was compounded using Kit (Pharmacia). Compound cDNA was saved at -20 degree C.

[0082] The reaction mixture of the following which made the template the 1 chain cDNA prepared by the method stated to the cloning point of N-methyltransferase gene by the example 5 radiographic-PCR method was prepared. It is Peltier about this reaction mixture. Thermal cycler PCR was performed after the reaction for 95 degrees C / 1 minute using PTC-200 (Funakoshi) on the conditions to which for 95 degrees C / 1 minute, 45 degrees C / between, and 72 degrees C / between are made to react 30 cycles, and the resultant was obtained. [1 minute] [2 minute]

Template cDNA: 3microl 10xbuffer:5microl 2.5mM NTP:8microl NMT-1:1microl (50pmol)
NotI-(dT) 18:1microl (50pmol)

Sub cloning 0.8% to H2O:31microl ExTaq(TAKARA):1microl example 6 plasmid vector
Electrophoresis of the resultant obtained in the example 5 in TAE using agarose gel is performed, the band of the obtained purpose product is cut off, and it is GENE. DNA was collected from gel using CLEAN (Funakoshi). After carrying out ligation of the collected DNA to a pT7blue vector (Novagen), transformation was carried out to Escherichia coli DH5alpha. After performing a color selection using X-gal, liquid culture was performed by LB culture medium containing an ampicillin, and the plasmid was extracted and isolated by the alkali-SDS method. The existence of an insertion was checked by agarose electrophoresis. In this way, the DNA fragment containing N-methyltransferase gene was isolated in the plasmid.

[0083] The primer extension was performed in the following reaction mixture using the plasmid isolated in the determination example 6 of example 7 base sequence. A reaction condition is 25 cycle ***** about for 96 degrees C 96 degrees C / after making it react for 1 minute / 0.2 minutes, 50 degrees C / between, and 60 degrees C / between. [0.1 minute] [4 minute] DNA obtained by performing ethanol precipitation to reaction mixture Template suppression It dissolved in reagent and analyzed using the ABI-310 JIENE tick analyzer. In order to determine the array for a center section of the purpose DNA, the plasmid which carried out sub cloning of the DNA fragment which processed DNA by StyI and was obtained to pUC19 was used. Array number: Those primer arrays are shown in 6 ** 7.

[0084] composition plasmid DNA of primer extension reaction mixture (20ng) : 2microl Premix: -- the isolation of the 5 'isolation 5 of the upstream region' upstream region of the N-methyltransferase mRNA according 4micro to the IPrimer:1microl H2O:3microl example 85'RACE method -- 5' -Full RACE Core Set (TAKARA) was used. Array number: The array of the primer used for 8-17 is shown.

[0085] 1st compounded by the method described in the example 4 strand About cDNA, it is hybrid. After cyclization of the 1 chain cDNA by decomposition of RNA, and the ligation reaction, the primer of array number:8-12 or array number:13-17 was used, the PCR reaction was

performed based on the conventional method, and the resultant was obtained. Acrylamide electrophoresis separated the band of a resultant, DNA was collected from gel, and sub cloning was carried out to the pT7blue vector. Then, the base sequence of DNA inserted by the same method as examples 6 and 7 was determined.

[0086] The following operations were performed in order to reinclude N-methyltransferase gene in the Escherichia coli of 9N-methyltransferase of examples which carried out manifestation isolation in expression vector pET23d (Novagen).

[0087] the pT7blue vector in which the isolation N-methyltransferase gene DNA obtained in the example 6 is inserted -- a template -- carrying out -- array number: -- PCR was performed to 18 and 19 on condition that the following using the primer of a publication, and the resultant was obtained That is, a reaction condition is 30 cycle ***** about after [for 95 degrees C / 1.5 minutes], 95 degrees C / between, 52 degrees C / between, and 72 degrees C / between. [1 minute] [1 minute] [1 minute]

[0088] The fragment which processed the isolation N-methyltransferase gene DNA fragment by NcoI and EcoRI apart from this, and was obtained was inserted in the pET23d vector. Next, the above-mentioned PCR product was further inserted in the NcoI site of this pET23d vector, and N-methyltransferase manifestation plasmid was built. Transformation of this plasmid was carried out to Escherichia coli BL21 (DE3). After cultivating the obtained Escherichia coli at 37 degrees C for 2 hours, in addition, cultivation was performed at 30 degrees C for further 3 hours so that IPTG might be set to last concentration 0.3mM. An after [a cultivation end] harvest is carried out and they are 0.2ml 10mM(s) to the biomass of 3ml culture medium. The Tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 7.5), 0.1M NaCl, 1mM Ultrasonic spallation was intermittently performed for 1 minute in EDTA-Na2. The supernatant liquid obtained by performing 14,000rpm and centrifugal separation for 10 minutes in this was used as enzyme liquid.

[0089] The nucleotide sequence of the DNA fragment containing N-methyltransferase gene obtained here has the array of array number:2 from sequencing of examples 7 and 8, and a corresponding RNA nucleotide sequence is shown in array number:3. Moreover, the amino acid sequence of corresponding N-methyltransferase is shown in array number:1.

[0090] The reaction mixture for N-methyltransferase activity measurement is 100mM. The Tris-hydrochloric-acid buffer solution (pH 8.5), 0.2mM MgCl2, 0.2mM 10micro of enzyme liquid I should be added to a paraxanthine and 4microM [methyl-14C] S-adenosylmethionine (0.9kBq), and volume of reaction mixture was set to 100microl. At 27 degrees C, the reaction for 10 minutes was performed, 1ml chloroform was added, the obtained 14C-cafeine was extracted, and the radioactivity of a chloroform layer was measured. As contrast, the thing excluding the paraxanthine from the thing which added xanthosine instead of or reaction mixture was used for reaction mixture. [the paraxanthine] As a result of the activity measurement, only when a paraxanthine was added as a substrate, what the cafeine of 1.56pmol(s) generated became clear.

[0091] The recombination vector which has an example 10 (suppression of composition of cafeine by anti sensing method) anti sense N-methyltransferase gene was built by the following methods.

[0092] The overall length of the isolation N-methyltransferase gene used in the example 9 was used as mold, and it amplified in PCR using the primer which has the array of a publication for the array numbers 20 and 21, and the end of the obtained DNA fragment was flush-end-ized by the BKL kit (product made from TAKARA), and the flush-end-ized PCR amplification fragment was obtained.

[0093] Moreover, the pBI vector (product made from clontech) which connected the hygromycin tolerance gene was cut by restriction enzymes XbaI and SacI, the beta-glucuronidase gene was removed, it was obtained and the end of a ***** vector was made into the flush end.

[0094] this flush-end-izing -- a line -- the vector was combined using the above-mentioned flush-end-ized PCR amplification fragment and the ligation kit (product made from TAKARA), and the vector which has N-methyltransferase gene of the request inserted in the position where it is obtained and this gene may function on the lower stream of a river of CaMV35S promotor in pBI in an opposite direction from a **** resultant was chosen by sequencing Thus,

the recombination vector of the request in which the anti sense N-methyltransferase gene was inserted was obtained. And this was used for the following transformations.

[0095] About the conventional method of the caffeine biosynthesis by the tissue culture of coffee, there are many (1983) reports of Planta, 108, 339 (1972), Plant Cell Reports, 2, 109, etc. until now. According to these conventional methods, the callus was guided from the apex or **** of coffee. The recombination vector built above by the obtained callus by the party Kurgan method was introduced. Or the protoplast of this callus was prepared, it rearranged to this protoplast by the electroporation method, and the vector was introduced into it. The cell which shows marker resistance was selected after introduction. The selected cell was cultivated under the Ming conditions and measured enzyme activity by the method of a publication in the example 9 to the transformed cell. Consequently, the thing which have not introduced the anti sense N-methyltransferase DNA and which is usually being intentionally decreased as compared with a cell made clear production of the caffeine in the cell which introduced the anti sense N-methyltransferase DAN.

[0096] Furthermore, the coffee cultured cell which carried out the transformation was made to redifferentiate, and the seedling object was acquired. The method of redifferentiation was performed in the reference containing Z.Pflanzenphysiol.Bd., 81, 395 (1977), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 8, and 243 (1987) according to the conventional method of a publication. Enzyme activity was measured by the method of a publication in the example 9 using the leaf of a seedling object. Consequently, decreasing intentionally with the plant body which has not introduced the anti sense N-methyltransferase DNA made clear caffeine production of the plant body which introduced the anti sense N-methyltransferase DNA.

[0097]

[Effect of the Invention] According to this invention, it becomes possible to produce efficiently N-methyltransferase which can be used as industrial use, a food grade, or a medical-application enzyme.

[0098] According to this invention, it becomes possible to change the caffeine biosynthesis metabolism of caffeine production vegetation, a plant tissue, or a plant cell, and to produce the compound of a caffeine metabolic system efficiently.

[0099] According to this invention, it becomes possible to change the caffeine biosynthesis metabolism of caffeine production vegetation, a plant tissue, or a plant cell, and to change the generation ratio of the compound group of a caffeine metabolic system.

[0100]

[Layout Table]

SEQUENCE LISTING <110>. MITSUI CHEMICALS, INC.<120>Gene-Encoding-Caffeine-Synthesis-System-Associated-Enzyme-and-Use-thereof<150>JP 146358/1999<151>1999-05-26<160> 20<210> 1<211> 356<212> PRT<213> Camellia sinensis<400> 1Phe Met Asn Arg Gly Glu Gly Glu Ser Ser Tyr Ala Gln Asn Ser Ser 5 10 15 Phe Thr Gln Gln Val Ala Ser Met Ala GlnPro Ala Leu Glu Asn Ala 20 25 30 Val Glu Thr Leu Phe Ser Arg Asp Phe His Leu Gln Ala Leu Asn Ala 35 40 45 Ala Asp Leu Gly Cys Ala Ala Gly Pro Asn Thr Phe Ala Val Ile Ser 50 55 60 Thr Ile Lys Arg Met Met Glu Lys Lys Cys Arg Glu Leu Asn Cys Gln65 70 75 80 Thr Leu Glu Leu Gln Val Tyr Leu Asn Asp Leu Phe Gly Asn Asp Phe 85 90 95 Asn Thr Leu Phe Lys Gly Leu Ser Ser Glu Val Ile Gly Asn Lys Cys 100 105 110 Glu Glu Val Pro CysTyr Val Met Gly Val Pro Gly Ser Phe His Gly 115 120 125 Arg Leu Phe ProArg Asn Ser Leu His Leu Val His Ser Ser Tyr Ser 130 135 140 Val His Trp Leu Thr Gln Ala Pro Lys Gly Leu Thr Ser Arg Glu Gly145 150 155 160 Leu Ala Leu Asn Lys Gly Lys Ile Tyr Ile Ser Lys Thr Ser Pro Pro 165 170 175 Val Val Arg Glu Ala Tyr Leu Ser Gln Phe His Glu Asp Phe Thr Met 180 185 190 Phe Leu Asn Ala Arg Ser GlnGlu Val Val Pro Asn Gly Cys Met Val 195 200205 Leu Ile Leu Arg Gly Arg GlnCysSer Asp Pro Ser Asp Met Gln Ser 210 215 220 Cys Phe Thr Trp Glu Leu Leu Ala Met Ala Ile Ala Glu Leu Val Ser225 230 235 240 Gln Gly Leu Ile Asp Glu Asp Lys Leu Asp Thr Phe Asn Ile Pro Ser 245 250 255 Tyr Phe Ala Ser Leu Glu Glu Val Lys Asp Ile Val Glu Arg Asp Gly 260 265 270 Ser Phe Thr Ile Asp His Ile Glu Gly Phe Asp Leu Asp Ser Val Glu 275 280 285 Met Gln Glu Asn Asp Lys Trp Val Arg Gly Glu Lys Phe Thr Lys Val 290 295 300 Val Arg Ala Phe Thr GluPro Ile Ile Ser Asn Gln Phe Gly Pro Glu305 310 315 320 Ile Met Asp Lys Leu Tyr Asp Lys Phe Thr His Ile Val Val Ser Asp

325 330335 Leu Glu Ala Lys Leu Pro LysThr Thr Ser Ile Ile Leu Val Leu Ser 340 345 350Lys Ile
 Asp Gly 355 <210> 2 <211> 1427<212> DNA <213> Camellia sinensis <400> 2 tgatatact
 gctgtggcag ctggcctctttgtataaaa attacttttc tgacgaggca 60 tggagctagc tactgcgggg aaggtgaacg
 aagtgttgtt catgaacagg ggggaaggag120 aaagtagtta tgcacaaaac tcttctttca cgcaacaagt ggcctcaatg
 gcacagccag 180cgctagaaaa tgcagttgaaactctcttct ccagagattt ccaccttcaa gctcttaacg
 240cagcggactt ggttgtgca gcgggtccaa acacattcgc agtgatttct acgatcaaga 300gaatgatgga
 aaagaaatgc agggaaatga attgccaaac actggaactt caggtttact 360tgaatgatct ttttgaaat gatttcaata
 ccctcttcaa aggcctgtcgtctgaggtta 420 ttgtaacaa atgtgaggaa gttccgtgtt atgtgatggg
 agtaccggggtctttccatg 480gccgggcttt tctcgtaac agcttacatt tagttcattc ctcttacagt gttcattggc
 540ttactcaggc accaaaagga ctcaacagca gagaaggctt ggcattaaac aagggaaga 600ttacatc
 aaagacaagc cctcctgttg taagagaagc ctacttatct caatttcag 660aagatttcac aatgtttctc aatgctagat
 cccaagaggt ggttccaaat gttgtatgg 720tgttgatact tcgtgttagg caatgttctg atccttcaga catgcagagc
 tgctttactt 780gggaactatt agctatggcc attgctgaat tggtttcaca gggattgata gatgaagata 840aattagacac
 cttaatatata cccagctatt ttgcatcact tgaggaagtg aaagatatag 900tggagaggga cggatcattc acaattgatc
 atatagaggg gtttgatctt gatagcgtag 960aaatgcagga gaatgataaa tgggtagag gggaaaagt taccaaggtt
 gtcagggcct 1020tcacagagcc tataatttca aaccagtttg gacctgaaat catggacaaa ctatatgaca
 1080aattcactca cattgtagt ttagatttgg aagcaaagct accgaagacc acaagtatca 1140tcctagtgt
 ttccaagatt gatggatagt tttttagtgt tgtgaaataa actgttgc 1200ctatcacata tatgccacta gagggttg
 ccaatgtatt gcacaagaag atttgagagg 1260ggtaaatat agaaagcatt ttgctcttgt gtggagagag aatgttttct
 tgatttaaat 1320ctgtgatacc caaatcgtaa tgttggaag aaatgagaag tgaacatga aattttaaaa 1380
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaatt cctgcggccg cgaattc 1427 <210> 3 <211> 1427<212> RNA
 <213> Camellia sinensis <400> 3 ugauaucacu gcuguggcag cuggccucu ugcuaaaaa auuacuuuuc
 ugacgaggca 60uggagcuagc uacugcgggg aaggugaacg aaguguuguu caugaacagg ggggaaggag
 120aaaguaguua ugcacaaaac ucuucuuuca cgcaacaagu ggccucaaug gcacagccag
 180cgcuagaaaaugcaguugaa acucucuucu ccagagauuu ccaccucaa gcucuuaacg 240 cagcggacuu
 gguugugca gcggguccaa acacauucgc agugauuuucacgaucaaga 300 gaaugaugga aaagaaugc
 agggaaauuga auugccaaac acuggaacuu cagguuuacu 360 ugaaugaucu uuugggaaau gauuucuuua
 ccucuucuaa aggccugucg ucugagguua 420 uugguaacaa augugaggaa guuccguguu augugauggg
 aguaccgggg ucuuuccaug480 gccggcuuuu uccucguaac agcuuacuu uaguucuuuc cucuuacagu guu.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-37490

(P2001-37490A)

(43)公開日 平成13年 2月13日 (2001. 2. 13)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 H 5/00		A 0 1 H 5/00	A
C 1 2 N 1/15		C 1 2 N 1/15	
1/19		1/19	
1/21		1/21	

審査請求 未請求 請求項の数25 O L (全 17 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-151718(P2000-151718)	(71)出願人	000005887 三井化学株式会社 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号
(22)出願日	平成12年 5月23日 (2000. 5. 23)	(72)発明者	水野 美砂子 茨城県牛久市中央3-13-5-104
(31)優先権主張番号	特願平11-146358	(72)発明者	芦原 坦 東京都大田区南久が原1-5-15
(32)優先日	平成11年 5月26日 (1999. 5. 26)	(72)発明者	水野 幸一 茨城県牛久市中央3-13-5-104
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(72)発明者	藤村 達人 茨城県つくば市吾妻2-2-2
		(74)代理人	100088328 弁理士 金田 暢之 (外2名)

(54)【発明の名称】 カフェイン合成系関連酵素をコードする遺伝子及びその用途

(57)【要約】

【課題】 本発明は、カフェイン合成系にあるN-メチルトランスフェラーゼをコードするDNAの全部もしくは一部を微生物または植物細胞にセンスまたはアンチセンスの形で組み込むことにより、(1)工業用、食品用または医療用酵素として利用できるN-メチルトランスフェラーゼの効率的な生産、(2)カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変することによるカフェイン代謝系の化合物の効率的生産、及び(3)カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変することによるカフェイン代謝系の化合物群の生成比の改変等の課題を達成する。

【解決手段】 配列番号1に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列の変異体をコードするDNAまたはRNAをセンスまたはアンチセンスの形で組み込んだベクターで、微生物、植物体または培養細胞を形質転換する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のヌクレオチド配列：

(a) 配列表の配列番号：1のアミノ酸配列を有し、7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼとしての酵素活性を有するポリペプチドであるN-メチルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列、(b) 前記ヌクレオチド配列(a)に、該ヌクレオチド配列(a)がコードするポリペプチドが前記酵素活性を維持し得る範囲内で、ヌクレオチドの置換、欠失または挿入を行って得られた変異ヌクレオチド配列のいずれかを有することを特徴とするDNA分子。

【請求項2】 前記ヌクレオチド配列(a)と前記変異ヌクレオチド配列(b)とがストリンジントな条件下でハイブリダイズし得るものである請求項1に記載のDNA分子。

【請求項3】 前記ヌクレオチド配列(a)が、配列表の配列番号：2のヌクレオチド配列からなる請求項1または2に記載のDNA分子。

【請求項4】 以下のヌクレオチド配列：

(a) 配列表の配列番号：1のアミノ酸配列を有し、7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼとしての酵素活性を有するポリペプチドであるN-メチルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列、(b) 前記ヌクレオチド配列(a)に、該ヌクレオチド配列(a)がコードするポリペプチドが前記酵素活性を維持し得る範囲内で、ヌクレオチドの置換、欠失または挿入を行って得られた変異ヌクレオチド配列のいずれかを有することを特徴とするRNA分子。

【請求項5】 前記ヌクレオチド配列(a)と、前記変異ヌクレオチド配列(b)がストリンジントな条件下でハイブリダイズし得るものである請求項4に記載のRNA分子。

【請求項6】 前記配列(a)が、配列表の配列番号：3のヌクレオチド配列からなる請求項4または5に記載のRNA分子。

【請求項7】 請求項1～3のいずれかに記載のDNA分子と、該DNA分子によりコードされた前記N-メチルトランスフェラーゼを植物細胞中で発現させるための構成と、を有することを特徴とする発現用ベクター。

【請求項8】 宿主細胞を請求項7に記載の発現用ベクターで形質転換して得られたものであることを特徴とする形質転換細胞。

【請求項9】 前記宿主細胞が微生物細胞である請求項8に記載の形質転換細胞。

【請求項10】 請求項8または9に記載の形質転換細胞を培養して、前記酵素活性を有するN-メチルトラン

スフェラーゼの製造方法。

【請求項11】 請求項1～3のいずれかに記載のDNA分子の有するヌクレオチド配列の全部又は一部に相補的なヌクレオチド配列であって、前記酵素活性を有する植物細胞に導入されて発現した場合に、該植物細胞の該酵素活性を阻害し得ることを特徴とするDNA分子。

【請求項12】 請求項4～6のいずれかに記載のRNA分子の有するヌクレオチド配列の全部又は一部に相補的なヌクレオチド配列であって、前記酵素活性を有する植物細胞に導入されて発現した場合に、該植物細胞の該酵素活性を阻害し得ることを特徴とするRNA分子。

【請求項13】 請求項1～6及び11～12のいずれかに記載のDNA分子またはRNA分子を含むベクター。

【請求項14】 微生物および植物の少なくとも一方の細胞内で、7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼの酵素活性を有するN-メチルトランスフェラーゼを発現させることができるか、もしくは該N-メチルトランスフェラーゼの発現を阻害する機能を有する請求項13に記載のベクター。

【請求項15】 請求項13または14に記載のベクターで形質転換された微生物。

【請求項16】 請求項13または14に記載のベクターで形質転換された植物細胞、植物組織または植物体。

【請求項17】 請求項13または14に記載のベクターが、感染により導入された請求項16に記載の植物細胞、植物組織または植物体。

【請求項18】 請求項16または17に記載の植物細胞、植物組織または植物体を用いて植物二次代謝産物を製造する方法。

【請求項19】 請求項16または17に記載の植物細胞、植物組織または植物体を用いて植物二次代謝産物の組成を改変する方法。

【請求項20】 請求項16または17に記載の植物細胞または植物組織を培養するか、植物体を栽培して、植物二次代謝産物を製造する方法。

【請求項21】 請求項16または17に記載の植物細胞または植物組織を培養するか、植物体を栽培して、植物二次代謝産物の組成を改変する方法。

【請求項22】 植物二次代謝産物が、7-メチルキサンチン、バラキサンチン、テオブロミン及びカフェインからなる群から選ばれる少なくとも1つ以上の化合物である請求項18～21のいずれかに記載の方法。

【請求項23】 形質転換植物体が、ツバキ(Camellia)属植物、コーヒー(Coffea)属植物、コラノキ(Cola)属植物、モチノキ(Ilex)属植物、ネエア(Neea)属植物、アオギリ(Firmiana)属植物、ポーリニア(Paullinia)属植物又はカカオノキ(Theobroma)属植物体

である請求項18～21のいずれかに記載の方法。

【請求項24】 7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼとしての酵素活性を有するN-メチルトランスフェラーゼであって、(a)配列表の配列番号：1のアミノ酸配列、または(b)配列表の配列番号：1のアミノ酸配列に、該アミノ酸配列に、前記酵素活性を損なわない範囲内でのアミノ酸の置換、挿入または欠失を行って得られた変異アミノ酸配列を有することを特徴とするN-メチルトランスフェラーゼ。

【請求項25】 前記アミノ酸配列(a)をコードするヌクレオチド配列と、前記変異アミノ酸配列(b)をコードするヌクレオチド配列とがストリンジントな条件下でハイブリダイズし得るものである請求項25に記載のN-メチルトランスフェラーゼ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、カフェイン合成系を構成する酵素の一つである7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼの3つのメチルトランスフェラーゼ活性を*

*同時に有するポリペプチドであるN-メチルトランスフェラーゼ及びその変異体、これらのいずれかをコードするヌクレオチド配列を有するDNA分子またはRNA分子、これらの分子を用いたベクター、該ベクターによる形質転換細胞及びこれらの用途に関する。

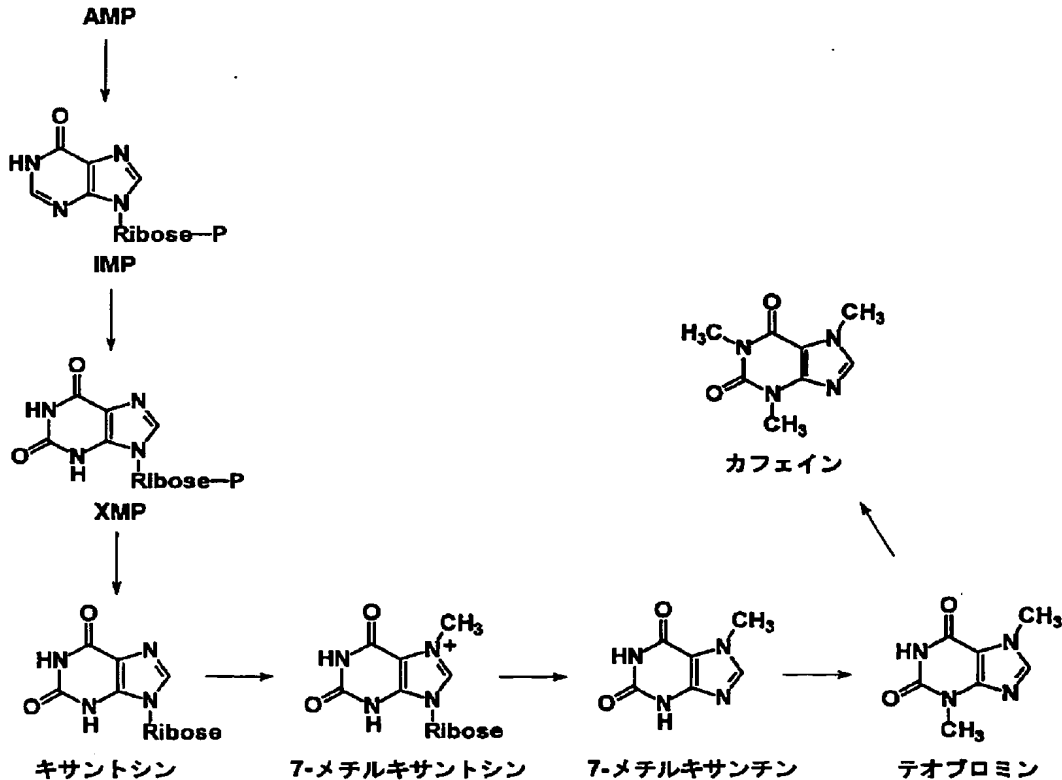
【0002】

【従来の技術】カフェインは、チャ(*Camellia sinensis*)などのツバキ科ツバキ属植物やコーヒー(*Coffea arabica*)等のアカネ科コーヒー属植物等に含まれるプリンアルカロイドで、医薬品原料や食品添加物として使用されている。現在のところ、カフェインは前記植物種を始めとするカフェイン産生植物からの抽出、または有機合成によって製造されている。また、チャやコーヒーなどの嗜好品においては、それらの刺激性を緩和または又は増強するために、古典的な育種手法等を用いてカフェインおよびその中間体の含有量の低減または増加が試みられている。

【0003】*Phytochemistry*, 31, 2575- (1992)には、カフェインがキサンチンから3段階のN-メチル化を経て生合成されることが¹⁴C-トレーサー実験により明らかにされている。この反応経路を以下に示す。

【0004】

【化1】



【0005】このメチル化を触媒する酵素活性、すなわちメチルトランスフェラーゼ活性は、1975年にチャ

葉の粗抽出液を用いた研究で最初に報告された(*Biochem. J.*, 146, 87- (1975))。コーヒーでメチルトランス

フェラーゼの精製が試みられているが (Phytochemistry, 37, 1577- (1994))、精製倍率はきわめて低い。チャでは、メチルトランスフェラーゼの部分精製の報告はあるが (Physiol. Plant., 98, 629- (1996))、酵素タンパク質は単離されていない。

【0006】以上のように、カフェイン合成系酵素、即ち、カフェインの生合成の最終反応である7-メチルキサンチン→テオブロミン→カフェインの2段階のメチル化反応を触媒するN-メチルトランスフェラーゼの10 アミノ酸配列及びそのアミノ酸配列をコードするDNAに関しては、これまでのところ全く知られていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、カフェインの合成に有用なカフェイン合成系を構成する酵素の一つである7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼとしての酵素活性を同時に有するN-メチルトランスフェラーゼ、微生物や植物におけるカフェイン生産の増強や抑制に有用なこのN-メチルトランスフェラーゼをコードするDNAまたはRNA分子、及びそれを用いたベクター等を提供することにある。

【0008】例えば、本発明にかかるDNA分子の全部もしくは一部を、微生物または植物細胞に、センスまたはアンチセンスの形で組み込むことにより、以下の目的を達成することが可能となる。

(1) 工業用、食品用または医療用酵素として利用できるN-メチルトランスフェラーゼを効率よく生産する。

(2) カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変してカフェイン代謝系の化合物を効率よく生産する。

(3) カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変してカフェイン代謝系の化合物群の生成比を改変する。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究の結果、チャの幼葉から部分精製された7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼの3つの酵素活性を同時に有するポリペプチドとしてのN-メチルトランスフェラーゼのN末端アミノ酸配列を解析した。その結果を基に、DNAプローブを作成し、このプローブを用いてRT-PCR法および5' RACE法により目的とするDNA分子を単離することに成功した。

【0010】次に、このDNA分子をベクターに組み込んだ後、大腸菌に導入し、当該DNA分子に由来するポリペプチドを大量に発現させた。発現したポリペプチドを回収してその酵素学的性質を調べたところ、チャの幼葉から分離した上記の3種のN-メチルトランスフェラ

ーゼ活性を有するポリペプチドと同一の反応、すなわちバラキサンチンからのカフェインの生成が認められ、当該DNA分子がカフェイン合成系を構成する酵素の一つである上記の3つのN-メチルトランスフェラーゼ活性を同時に有するN-メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を有することを確認した。

【0011】S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体としてキサンチン類化合物やキサンチン類化合物にN-メチル化を行う植物であれば、本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼあるいはそれと同一の酵素活性を有するポリペプチド、更にはこれらをコードするDNAが含まれていると推測され、本発明に記載の方法を用いれば、それらの植物からも、本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼあるいはそれと実質的に同一の酵素、更にはこれらをコードするDNA分子またはRNA分子を得ることができる。

【0012】本発明者らは以上の知見に基づいて本発明を完成するに至った。すなわち、本発明には以下の各態様が含まれる。

【0013】本発明にかかるDNA分子は、以下のヌクレオチド配列：

(a) 配列表の配列番号：1のアミノ酸配列を有し、7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼとしての酵素活性を有するポリペプチドであるN-メチルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列、及び(b) 前記ヌクレオチド配列(a)に、該ヌクレオチド配列(a)がコードするポリペプチドが前記酵素活性を維持し得る範囲内で、ヌクレオチドの置換、欠失または挿入を行って得られた変異ヌクレオチド配列のいずれかを有することを特徴とする。

【0014】この変異ヌクレオチド配列(b)としては、ヌクレオチド配列(a)とストリンジントな条件下でハイブリダイズし得るものが好ましい。

【0015】本発明にかかるRNA分子は、以下のヌクレオチド配列：

(a) 配列表の配列番号：1のアミノ酸配列を有し、7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼとしての酵素活性を有するポリペプチドであるN-メチルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列、及び(b) 前記ヌクレオチド配列(a)に、該ヌクレオチド配列(a)がコードするポリペプチドが前記酵素活性を維持し得る範囲内で、ヌクレオチドの置換、欠失または挿入を行って得られた変異ヌクレオチド配列のいずれかを有することを特徴とする。

【0016】この変異ヌクレオチド配列(b)としては、ヌクレオチド配列(a)とストリンジントな条件

下でハイブリダイズし得るものが好ましい。

【0017】本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼ発現用のベクターは、上記のDNA分子と、該DNA分子によりコードされたN-メチルトランスフェラーゼを植物細胞中で発現させるための構成と、を有することを特徴とする。この発現用ベクターを用いて、宿主細胞を形質転換することで、形質転換細胞を得ることができる。更に、この形質転換細胞を培養して、前記酵素活性を有するN-メチルトランスフェラーゼを製造することができる。

【0018】本発明にかかるDNA分子の他の態様は、上記のDNA分子の有するヌクレオチド配列の全部又は一部に相補的なヌクレオチド配列であって、前記酵素活性を有する植物細胞に導入されて発現した場合に、該植物細胞の該酵素活性を阻害し得ることを特徴とする。

【0019】本発明にかかるRNA分子の他の態様は、上記のRNA分子の有するヌクレオチド配列の全部又は一部に相補的な配列であって、前記酵素活性を有する植物細胞に導入されて発現した場合に、該植物細胞の該酵素活性を阻害し得ることを特徴とする。

【0020】本発明にかかるベクターの一態様は、上記のDNA分子及びRNA分子のいずれかを含むことを特徴とする。このベクターは、例えば、微生物および/または植物の細胞内で、7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼの酵素活性を有するN-メチルトランスフェラーゼを発現させることができるか、もしくは該N-メチルトランスフェラーゼの発現を阻害する機能を有するものとして提供することができる。このベクターを用いて、微生物、植物細胞、植物組織または植物体を形質転換することができ、得られた形質転換体も本発明に含まれる。この植物細胞、植物組織または植物体の形質転換体を用いて植物二次代謝産物を製造させることができる。また、この植物細胞、植物組織または植物体を用いて植物二次代謝産物の組成を改変することができる。

【0021】本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼは、7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼとしての酵素活性を有するポリペプチドであって、(a)配列表の配列番号：1のアミノ酸配列、または(b)配列表の配列番号：1のアミノ酸配列に、該アミノ酸配列に、前記酵素活性を損なわない範囲内でのアミノ酸の置換、挿入または欠失を行って得られた変異アミノ酸配列を有することを特徴とする。

【0022】この変異アミノ酸配列(b)としては、アミノ酸配列(a)をコードするDNAと、この変異アミノ酸配列(b)をコードするDNAとがストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るものが好ましい。

【0023】本発明によれば、カフェインの合成、微生物や植物において生産されるカフェインの組成の改変などに有用なカフェイン合成系を構成する酵素の一つである7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼとしての酵素活性を同時に有するポリペプチドであるN-メチルトランスフェラーゼをコードするDNA分子及びRNA分子が提供される。

10 【0024】

【発明の実施の形態】本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼは、7-メチルキサンチンN3メチルトランスフェラーゼ、テオブロミンN1メチルトランスフェラーゼ及びバラキサンチンN3メチルトランスフェラーゼとしての酵素活性を同時に有するポリペプチドである。

【0025】このN-メチルトランスフェラーゼとしては、配列番号：1に示したアミノ酸配列を有しているもの、配列番号：1のアミノ酸配列に、所望とするN-メチルトランスフェラーゼ活性を損なわない範囲で、アミノ酸の置換、挿入または欠失を行って得られた変異アミノ酸配列を有しているものを挙げることができる。すなわち、所望とする上記のN-メチルトランスフェラーゼ活性を有する配列番号：1のアミノ酸配列及びその変異配列を有するポリペプチドをN-メチルトランスフェラーゼと総称する。

【0026】上記の変異アミノ酸配列を有するポリペプチドとしては、それ自身が実質的にチャコ葉のN-メチルトランスフェラーゼと同等の機能を有し、且つ配列番号：1のアミノ酸配列と酵素活性にかかわる部位において高い相同性を有しているものを挙げることができる。

【0027】一般に同等の機能を有する複数の酵素間において、酵素活性に必須である部位以外のアミノ酸配列の相同性は非常に低いことがあることは良く知られている(Kawaqoe et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93, 12082-(1996))。従って、全体としての相同性が低い場合でも、活性にかかわる部位において高い相同性を有するものは本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼとして分類できる。

40 【0028】アミノ酸配列全体として比較した場合における変異アミノ酸配列としては、配列番号：1のアミノ酸配列に対して、15%以上の相同性、好ましくは30%以上の相同性、より好ましくは45%以上の相同性、更に好ましくは60%以上の相同性、さらにより好ましくは75%以上の相同性、さらにより一層好ましくは90%以上の相同性、最も好ましくは95%以上の相同性を有し、かつ所望のN-メチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを提供できる変異アミノ酸配列を挙げることができる。

50 【0029】なお、配列番号：1のアミノ酸配列を基準

とした変異を、これらをコードするヌクレオチド配列のレベルで表現した場合、変異アミノ酸配列をコードする変異ヌクレオチド配列としては、配列番号：1のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に対して、35%以上の相同性、好ましくは60%以上の相同性、より好ましくは75%以上の相同性、さらに好ましくは90%以上の相同性、更に好ましくは95%以上の相同性を有する変異ヌクレオチド配列を挙げることができる。

【0030】本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列、すなわちN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子としては、配列番号：1のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を挙げることができ、その具体例としては、配列番号：2のDNA配列、配列番号：3のRNA配列を挙げることができる。これらのN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子に対して、上記で規定される相同性を有するヌクレオチド配列も本発明におけるN-メチルトランスフェラーゼをコード遺伝子に含まれる。

【0031】所望とするN-メチルトランスフェラーゼ活性を維持した変異アミノ酸配列としては、この変異アミノ酸配列をコードする変異ヌクレオチド配列と、配列番号：1のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列とがストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るものが実用上好適に利用し得る。

【0032】また、変異N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子としても、配列番号：1のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るものが実用上好適に利用し得る。その具体例としては、配列番号：2のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNA分子及び配列番号：3のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るRNA分子を挙げることができる。

【0033】このストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、例えば、Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Current Protocols in Molecular Biology; Wiley Interscienceに記載の方法によって行うことができ、市販のシステムとしては、GeneImageシステム（アマシャム）を挙げることができる。具体的には以下の操作によってハイブリダイゼーションを行うことができる。

【0034】試験すべきDNAまたはRNA分子を転写した膜を、製品プロトコルに従って、標識したプローブとプロトコル指定のハイブリダイゼーションバッファ中でハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションバッファの組成は、0.1重量% SDS、5重量% デキストラン硫酸、1/20容のキット添付のブロッキング試薬及び2~7×SSCからなる。ブロッキング試薬としては、例えば、100×Denhardt's solution、2%（重量/容量）Bovine serum albumin 2%（重量

/容量）Ficoll™ 400、2%（重量/容量）ポリビニルピロリドンを5倍濃度で調製したものを1/20に希釈して使用することができる。20×SSCは、3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸溶液であり、SSCは、より好ましくは、3~6×SSC、更に好ましくは、4~5×SSCの濃度で使用する。

【0035】ハイブリダイゼーションの温度は、40~80℃、より好ましくは50~70℃、更に好ましくは55~65℃の範囲であり、数時間から一晚のインキュベーションを行った後、洗浄バッファで洗浄する。洗浄の温度は、好ましくは室温、より好ましくはハイブリダイゼーション時の温度である。洗浄バッファの組成は、6×SSC+0.1重量% SDS溶液、より好ましくは4×SSC+0.1重量% SDS溶液、更に好ましくは2×SSC+0.1重量% SDS溶液、更に好ましくは1×SSC+0.1重量% SDS溶液、最も好ましくは0.1×SSC+0.1重量% SDS溶液である。このような洗浄バッファで膜を洗浄し、プローブがハイブリダイズしたDNA分子またはRNA分子を、プローブに用いた標識を利用して識別することができる。

【0036】なお、変異は、自然界において生じたものでもよく、ヌクレオチド配列における部位突然変異により人工的に起こしたものでも良い。

【0037】本発明のN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子を有するDNA分子は、例えば、N-メチルトランスフェラーゼをコードするDNA分子に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCR技術（植物のPCR実験プロトコル（細胞工学別冊、植物細胞工学シリーズ2）秀潤社(1995)）を利用して、本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼを生産する細胞から分離することができる。

【0038】具体的には、mRNAから合成したcDNAにリンカーを結合させ、N-メチルトランスフェラーゼを構成するアミノ酸配列をコードするDNAとリンカー間でPCRを行うこと等により、目的cDNAの全長配列を単離することができる。

【0039】このようなハイブリダイゼーション技術やPCR技術により得られるN-メチルトランスフェラーゼをコードするDNA分子は、少なくとも単離に使用した部位においては、配列番号：2に記載のN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子と相同性を有する。ここで相同性とは、それぞれのN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子がコードするアミノ酸配列の比較において15%以上の相同性、好ましくは30%以上の相同性、より好ましくは45%以上の相同性、更に好ましくは60%以上の相同性、さらにより好ましくは75%以上の相同性、さらにより一層好ましくは90%以上の相同性、最も好ましくは95%以上の相同性を指す。ただし、得られるN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子によっては、コードするアミノ酸の複数の残基が欠失、付加、置換された結

果として、N-メチルトランスフェラーゼとの相同性が15%以下となってもなお、N-メチルトランスフェラーゼの機能に必須な領域を保持し、実質的にN-メチルトランスフェラーゼと同等の機能を有するタンパク質をコードしていることも想定される。

【0040】本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列（遺伝子）を有するDNA分子またはRNA分子を単離するために用いる生物としては、カフェインまたはその前駆体を産生する生物であればすべて使用できるが、中でもチャなどのツバキ科ツバキ（Camellia）属植物、コーヒーなどのアカネ科コーヒー（Coffea）属植物、コラノキなどのアオギリ科コラノキ（Cola）属植物などを例示することができる。

【0041】本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子を有するRNA分子は、Sp6プロモーターやT7プロモーターといったRNAポリメラーゼが認識するプロモーターの下流に、上記方法で得たN-メチルトランスフェラーゼDNAを所望の向きで、機能し得る位置に接続して組換え分子を調製し、これをSp6 RNAポリメラーゼやT7 RNAポリメラーゼなどのRNAポリメラーゼで翻訳させて得ることができる。また、植物ウイルスにN-メチルトランスフェラーゼDNAないしRNAを導入するか、後で述べるように適当なDNA発現カセットにN-メチルトランスフェラーゼDNAを所望の向きで機能し得る位置に接続して組換え分子を形成し、この組換え分子を微生物や植物等の宿主に導入することにより宿主の転写活性を利用して得ることもできる。

【0042】N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子を有するDNA分子の全部または一部と相補性を有するDNA分子、あるいはN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子を有するRNA分子の全部または一部と相補性を有するRNA分子であって、カフェインまたはその前駆体を産生する宿主細胞中において発現した際に宿主細胞におけるN-メチルトランスフェラーゼの発現を阻害する機能を有するものは、宿主細胞におけるN-メチルトランスフェラーゼ発現の阻害または抑制用のDNA分子またはRNA分子として用いることができる。

【0043】ここで、N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子の一部とは、その部分に相補性を有する配列を基礎として得られる阻害用のmRNA、すなわちアンチセンスRNAが宿主細胞中で形成された際に、これが宿主細胞におけるN-メチルトランスフェラーゼを発現させるためのmRNAと結合して、宿主細胞におけるN-メチルトランスフェラーゼの発現が阻害される部分である。この部分としては、このようなアンチセンスmRNAの形成に必要な部分であり、例えば少なくとも14塩基長の長さの部分の挙げることができる。

【0044】アンチセンスmRNA形成用のDNA分子

としては、例えば、配列番号：2のヌクレオチド配列の全部または一部と相補性を有しているDNA分子を挙げることができ、アンチセンスRNA分子としては、配列番号：3のヌクレオチド配列の全部または一部と相補性を有しているRNA分子を挙げることができる。これらのヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る変異配列の全部または一部と相補性を有しているDNA分子またはRNA分子もこのような目的に用いることができる。

【0045】なお、これらの阻害用のDNA分子またはRNA分子に対して、高い相補性を有し、所望とする阻害又は抑制機能を発揮できるものも利用できる。ここで高い相補性とはそれぞれのヌクレオチド配列の比較において60%以上の相補性、好ましくは75%以上の相補性、さらに好ましくは90%以上の相補性、最も好ましくは95%以上の相補性を指す。

【0046】これらの阻害用のDNA分子またはRNA分子自体は、必ずしも本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼをコードするものでなくてもよい。

【0047】本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼ阻害用のヌクレオチド配列の他の態様としては、N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子と相補性を有する部分を有するが、N-メチルトランスフェラーゼをコードしていないヌクレオチド配列で、宿主細胞の有するN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子と置換されることで、宿主のN-メチルトランスフェラーゼ活性を消失させ得るものを挙げることができる。

【0048】これらN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子またはN-メチルトランスフェラーゼの発現を阻害または抑制する機能を有するDNA分子の宿主細胞内での発現について、宿主細胞として植物細胞を利用した例について以下に説明する。

【0049】植物細胞での発現は、(i) 宿主細胞内でのDNAからmRNAへの転写を可能とするプロモーター、(ii) プロモーターの下流にセンス方向またはアンチセンス方向に連結したN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片、またはN-メチルトランスフェラーゼの発現を阻害する機能を有するDNA断片、

(iii) 必要に応じてこれらDNA断片の下流に連結された転写産物の安定化に必要なポリアデニレーション部位を含むターミネーター配列、などを含む発現カセットを宿主である植物細胞に導入して、これを形質転換する方法が利用できる。

【0050】このような発現カセット、及びこれを含むベクターも本発明の対象である。

【0051】発現カセットは、挿入されているDNAを恒常的または誘導的に発現させるためのプロモーターを含有し得る。また、この発現カセットは、必要に応じて、植物細胞内での複製のための複製オリジンを有することができる。

【0052】恒常的に発現させるためのプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター、イネのアクチンプロモーターなどが挙げられる。また、誘導的に発現させるためのプロモーターとしては、例えば糸状菌、細菌、ウイルスの感染や侵入、低温、高温、乾燥、嫌気的条件、特定の化合物の散布等の外因によって発現することが知られているプロモーター等が挙げられる。このようなプロモーターとしては、例えば、糸状菌、細菌、ウイルスの感染や侵入によって発現するイネのキチナーゼ遺伝子のプロモーターやタバコのPRタンパク質遺伝子のプロモーター、低温によって誘導されるイネの「l i p l 9」遺伝子のプロモーター、高温によって誘導されるシロイヌナズナの「H S P 1 8 , 2」遺伝子のプロモーター、乾燥によって誘導されるイネの「r a b」遺伝子のプロモーター、嫌気的条件下で誘導されるトウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター等が挙げられる。またイネのキチナーゼ遺伝子のプロモーターとタバコのPRタンパク質遺伝子のプロモーターはサリチル酸等の特定の化合物によって、イネの「r a b」遺伝子プロモーターは植物ホルモンのアブシジン酸の散布によっても誘導される。

【0053】或いはまた、発現カセットに挿入されているDNAを発現させるためのプロモーターとしては、N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターを単離して利用する方法も挙げられる。

【0054】具体的なプロモーターの単離方法の一例には、N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子の全部又は一部をプローブとしたハイブリダイゼーション技術の利用により、ゲノムDNA断片を選択し、該遺伝子の上流部DNAを特定する方法を挙げることができる。

【0055】発現カセット中の組み換えDNA分子の植物への導入に備えるために、大腸菌の複製シグナル及び形質転換された細菌の細胞を選抜するためのマーカー遺伝子を含むクローニングベクターが数多く利用できる。このようなベクターの例には、pBR322、pUC系、M13mp系等がある。適当な制限酵素切断部位で、目的の配列をベクターに導入することができる。得られたプラスミドDNAの特徴を明らかにするため、制限酵素切断部位分析、ゲル電気泳動、及びその他の生化学的・分子生物学的方法が一般に用いられる。各々の操作を終えた後、プラスミドDNAを切断して、別のDNAに結合させることができる。各プラスミドDNAの配列を、同じプラスミド又は別のプラスミド中にクローニングすることができる。

【0056】植物細胞の中に発現カセットを導入するためには、さまざまな手法を用いることができる。これらの手法には、形質転換因子としてアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) または、アグロバクテリウム リゾゲネス (*Agrobacterium r*

hizoqenes) を用いたT-DNAによる植物細胞の形質転換、プロトプラストへの直接導入 (インジェクション法、エレクトロポレーション法等)、パーティクルガン法等やその他の可能性が含まれる。

【0057】プロトプラストへの直接導入では、特別に必要とされるベクターはない。例えば、pUC誘導体のような単純なプラスミドを用いることができる。目的の遺伝子を植物細胞に導入する方法によっては、他のDNA配列が必要になることもある。例えばTiまたはRiプラスミドを植物細胞の形質転換に用いる場合には、TiおよびRiプラスミドのT-DNA領域の少なくとも右端の配列、大抵は両端の配列を、導入されるべき遺伝子の隣接領域となるように接続するのが好ましい。

【0058】アグロバクテリウム属菌を形質転換に用いる場合には、導入すべき発現カセットを、特別のプラスミド、すなわち中間ベクターまたはバイナリーベクター中にクローニングする必要がある。中間ベクターはアグロバクテリウム属菌の中では複製されない。中間ベクターは、ヘルパープラスミドあるいはエレクトロポレーションによってアグロバクテリウム属菌の中に移行される。中間ベクターは、T-DNAの配列と相同な領域をもつため、相同組換えによって、アグロバクテリウム属菌のTiまたはRiプラスミド中に取り込まれる。宿主として使われるアグロバクテリウム属菌には、vir領域が含まれている必要がある。通常TiまたはRiプラスミドにvir領域が含まれており、その働きにより、T-DNAを植物細胞に移行させることができる。

【0059】一方、バイナリーベクターはアグロバクテリウム属菌の中で複製、維持され得るので、ヘルパープラスミドあるいはエレクトロポレーション法によってアグロバクテリウム属菌中に取り込まれると、宿主のvir領域の働きによって、バイナリーベクター上のT-DNAを植物細胞に移行させることができる。

【0060】なお、このようにして得られた発現カセットを含む中間ベクターまたはバイナリーベクター、及びこれを含む大腸菌やアグロバクテリウム属菌等の微生物も本発明の対象である。

【0061】形質転換された植物細胞は、再生過程を経ることにより植物組織または植物体に交換することができる。再生の方法は植物細胞の種類により異なるが、例えばイネではFujimuraら (Plant Tissue Culture Lett., 2, 74- (1995)) の方法、トウモロコシでは, Shillitoら (Bio/Technology, 7, 581- (1989)) の方法、シロイヌナズナではAkamaらの方法 (Plant Cell Rep., 12, 7- (1992)) などが挙げられる。

【0062】本発明において、「植物体」とは植物に分類される生物個体の全体もしくは一部の器官 (例えば、葉、莖、根、花、果実、種子等) を指す。

【0063】これらの方法により作出された植物体またはその繁殖媒体 (例えば種子、塊茎、切穂など) から得

た植物体は、カフェインまたはその前駆体を産生する野生型の植物体と比較して本発明のN-メチルトランスフェラーゼの発現量が増加し、宿主植物の代謝の改変によるカフェイン代謝系化合物の生成量の変化や、宿主植物の代謝の改変によるカフェイン代謝系化合物群の生成比の変化が起こる。このようにして得られたトランスジェニック植物は本発明の対象である。本発明でいう植物には、葉、花、果実、種子などの植物の特定の組織または細胞も含まれる。

【0064】また、近年植物のポストトランスレショナルなジーンサイレンシングの研究から、ウイルス等の外来核酸に対して植物が本来備えている防御機構を利用して、目的遺伝子の発現を抑制することが可能になってきた(Cell, 95, 177-187(1998)、化学と生物、37, 532-(1999)、蛋白質核酸酵素、44, 1396-(1999))。これによれば、DNAウイルスやRNAウイルス等が植物に進入した場合、植物はこれらの鋳型からアベラントRNAを転写し、植物が本来持っている配列の転写産物と配列特異的に二本鎖RNAを形成する。この二本鎖RNAはRNAseにより分解されることにより、目的の遺伝子の発現を抑制することが可能となる(Cell, 96, 303-(1999))。本方法の重要な特徴のひとつは、発現を抑制したい配列を目的植物に必ずしも形質転換させる必要がない点にある。また本方法のさらなる特徴は、植物の一部(下位葉等)に目的の核酸を感染等により導入すれば、その効果が植物体全体に広がることである。具体的な発現抑制方法は、目的遺伝子の配列またはそれと高い相同性を持つ配列の全部または一部を含む二本鎖RNAや、二本鎖DNAを持つアグロバクテリウムを植物の下位葉に感染させる。ここで高い相同性とはそれぞれの塩基配列の比較において60%以上の相同性、好ましくは75%以上の相同性、さらに好ましくは90%以上の相同性、最も好ましくは95%以上の相同性を指す。

【0065】この方法を施された植物体は、カフェインまたはその前駆体を産生する野生型の植物体と比較して本発明のN-メチルトランスフェラーゼタンパク質の発現量が増加し、宿主植物の代謝の改変によるカフェイン代謝系化合物の生成量の変化や、宿主植物の代謝の改変によるカフェイン代謝系化合物群の生成比の変化が起こる。このようにして得られた植物は本発明の対象である。本発明でいう植物には、葉、花、果実、種子などの植物の特定の組織または細胞も含まれる。

【0066】前記のSAMをメチル基供与体としてカフェインを生成する植物としては、チャなどのツバキ科ツバキ(Camellia)属植物、コーヒーなどのアカネ科コーヒー(Coffea)属植物、コロンキなどのアオギリ科コロンキ(Cola)属植物など、カフェイン産生植物を例示することができる。

【0067】本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼをコードするDNAを導入してN-メチルトランス

フェラーゼタンパク質を大量に発現させるための微生物としては、大腸菌や枯草菌等の細菌及びバキュロウイルス等のウイルスを例示することができる。

【0068】また、宿主細胞の代謝を改変して特定化合物の生産性向上や特定の化合物群の生成比改変を図ることを目的に、本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼをコードするDNAをセンスまたはアンチセンスの形で組み込んで形質転換植物を得るための植物としては、カフェインまたはその前駆体を産生する植物であればすべて使用できる。

【0069】上記の構成のベクターで形質転換された植物細胞または植物組織を培養して、あるいは同様に形質転換された植物体を栽培して、カフェイン合成系にかかる二次代謝産物の製造やこれらの形質転換体で生産される二次代謝産物の組成の改変を行うことができる。この二次代謝産物としては、例えば、7-メチルキサンチン、バラキサンチン、テオブロミン及びカフェインからなる群から選ばれる少なくとも1つ以上の化合物を挙げることができる。

【0070】形質転換に用いる植物細胞、植物組織または植物体の供給原としては、例えば、質転換植物体が、ツバキ(Camellia)属植物、コーヒー(Coffea)属植物、コロンキ(Cola)属植物、モチノキ(Ilex)属植物、ネエア(Neea)属植物、アオギリ(Firmiana)属植物、ボーリニア(Paullinia)属植物又はカカオノキ(Theobroma)属植物を挙げることができる。

【0071】中でもチャなどのツバキ科ツバキ(Camellia)属植物、コーヒーなどのアカネ科コーヒー(Coffea)属植物、コロンキなどのアオギリ科コロンキ(Cola)属植物などを好ましいものとして例示することができる。

【0072】さらに、本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼは、テオブロミンの他にも7-メチルキサンチンといった構造類似化合物もメチル化することができるので、前記の植物種以外であってもこれらキサンチンの構造類似化合物を含む植物であれば、本発明の方法を適用することができる。

【0073】なお、酵素学的な検討の結果、本発明にかかるN-メチルトランスフェラーゼは以下の基本的性質を有することが明らかになっている。

分子量: 41,000 (SDS-PAGE)、61,000 (ゲル過)

等電点: 4.5~5.0 (クロマトフォーカシング) 至適pH: 8.5

Km値: 21 μM (SAM)、24 μM (バラキサンチン)

阻害剤: SAH (S-アデノシルホモシステイン)

反応機構: SAM+バラキサンチン→SAH+カフェイン

【0074】

【実施例】以下、実施例および比較例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0075】実施例1

N-メチルトランスフェラーゼ精製画分の調製

1997年5月に鹿児島県枕崎市で採種した、チャ葉 (*Camellia sinensis* var. *Yabukita*) の第1、2、3葉を液体窒素を用いて凍結し、 -80°C で保存した。この材料100gを、1,000mlの5mM EDTA-Na2、5mM 2-メルカプトエタノール、5% (v/v) グリセリン、1mg アプロチニン、0.5% (w/v) アスコルビン酸ナトリウム、2.5% (w/v) 不溶性ポリビニルピロリドンを含む50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.3) を加えて磨砕し、3層のガーゼで濾過した後に濾液を遠心分離 (10,000g、15分) して上清を得た。この上清に対して50-80% 飽和硫酸分画を調製した。この分画をSephadex G-25を用いて脱塩し、2mM EDTA-Na2、2mM 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセリンを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) に溶解させた後に、同じ緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (15×160mm) に吸着させ、200ml 2mM EDTA-Na2、2mM 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセリンを含む10-200mMリン酸ナトリウム緩衝液の直線濃度勾配を用いて活性画分を溶出した。活性画分を集め、80% 飽和硫酸処理により沈殿を回収し、2mM EDTA-Na2、2mM 2-メルカプトエタノール、20mM K*

表 1

ステップ	画分	液量 (ml)	総活性 (pkat)	総タンパク質量 (mg)	比活性 (pKat/mg)	精製度 (倍)	産生量 (%)
1	粗抽出物	980	6330	581	10.9	1.0	100
2	硫酸アンモニウム	33.8	3410	155	22.0	2.0	53.9
3	ヒドロキシアパタイト	23.0	2630	28.9	91.0	8.0	41.5
4	Shodex IEC QA-824	7.5	1070	4.82	221	20.3	16.9
5	アデノシン-アガロース	2.0	202	0.08	2530	232	3.2
6	Superdex 200	5.8	228	0.04	5700	523	8.6

【0077】実施例2

N-メチルトランスフェラーゼ精製画分のアミノ末端アミノ酸配列の解析

最終精製標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、セミドライブロッティング装置を用いPVDFメンブレンに転写した。N-メチルトランスフェラーゼが転写された部位を切り取り、ABIプロテインシーケンサーを用いてN末端のアミノ酸配列を分析した。その結果を配列番号: 4に示す。

【0078】実施例3

N-メチルトランスフェラーゼのcDNAクローニング

*Cl、20% (v/v) グリセリンを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.4) に溶解した。脱塩処理を行った後に、同じ緩衝液で平衡化した高速液体クロマトグラフィー専用の陰イオン交換カラムShodex IEC QA-824 (8×25mm) に吸着させた。同じ緩衝液でカラムを洗浄後、36mlの20-750mM KCl (2mM EDTA-Na2、2mM 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセリンを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) に溶解) の直線濃度勾配で吸着タンパク質を溶出した。活性画分を集め、脱塩処理を行い、2mM EDTA-Na2、2mM 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセリンを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) に溶解した後、同じ緩衝液で平衡化したアフィニティーカラムであるアデノシン-アガロース (1ml) に吸着させた。0.2M NaCl、2mM EDTA-Na2、2mM 2-メルカプトエタノール、20% (v/v) グリセリンを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) で活性画分を溶出した。得られた画分を2mM 2-メルカプトエタノール、150mM KCl、20% (v/v) グリセリンを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) で平衡化したHiLoad Superdex 200 (16×600mm) を用いてゲル濾過を行い、最終精製標品を得た。表1にN-メチルトランスフェラーゼの精製過程における比活性の変化をまとめた。

【0076】

【表1】

40 のためのオリゴヌクレオチド

N末端の7アミノ酸残基に基づく19残基のオリゴヌクレオチドNMT-1とNotI-(dT)18プライマー (ファルマシアバイオテック) をプローブとした。配列番号: 5にNMT-1の配列を示す。

【0079】実施例4

N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニングのための1本鎖cDNAの合成

(1) total RNAの単離

5gの若いチャ葉を液体窒素存在下で乳棒、乳鉢を用いて破碎した。液体窒素の昇華後、50mlの3M Li

C1、8M 尿素を加えて、ポリトロンでさらに破碎した。4℃で一晩静置した後、12,000rpmで15分間、遠心分離を行った。沈殿を0.5% SDS、10mM Tris-塩酸緩衝液 (pH7.6) に懸濁し、総量で10ml程度にした。10mlのフェノール/クロロホルム溶液を加えて混合し、12,000rpm、10分間の遠心分離を行った。上清に1/10倍容の3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH4.8) を加え、さらに2倍容のエタノールを加えて-80℃で1時間静置した。4℃、12,000rpm、10分間の遠心分離を行い、上清を除去した沈殿に70% エタノールを加えて懸濁し、再度、遠心分離を行った。上清を除去し、真空ポンプでドライアップした。沈殿を1.5mlの水に溶かし、150μlの3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH4.8) を加え、さらに1.5mlのフェノール/クロロホルム溶液を加えて転倒混和し、12,000rpm、10分間の遠心分離を行った。上清に2倍容のエタノールを加え、-80℃で20分間静置した後、4℃で12,000rpm、10分間の遠心分離を行い得られた沈殿に70% エタノールを加えて、再度、遠心分離を行った。沈殿を1.5mlの水に溶かし、150μlの3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH4.8) を加え、さらに1.5mlのフェノール/クロロホルム溶液を加えて転倒混和し、12,000rpm、10分間の遠心分離を行った。上清に2倍容のエタノールを加え、-80℃で20分間静置した後、4℃で12,000rpm、10分間の遠心分離を行い得られた沈殿に70% エタノールを加えて、再度、遠心分離を行った。真空ポンプでドライアップした後、200μlの水に溶解し、total RNAの画分とした。

【0080】(2) mRNAの単離

上述の方法で得たtotal RNA (2mg) に65℃、5分間の熱処理を行った後、等量の2倍濃度A液 (10mM Tris-塩酸緩衝液 (pH7.5)、1mM EDTA-Na2、0.1% SDS、0.5M NaCl) と混合した。0.1gのoligo (dT)-Cellulose Type7 (ファルマシア) を2mlのB液 (10mM Tris-塩酸緩衝液 (pH7.5)、1mM EDTA-Na2、0.1% SDS、0.1M NaCl) 中で膨潤させ、その懸濁液を先端にガラスウールをつめたブルーチップに注ぎ、2.5mlの0.1N NaOHで洗浄した後、5mlのA液を流して平衡化した。このカラムにtotal RNAをアプライし、3mlのA液、4mlのB液を流した後に、mRNAを3mlのC液 (10mM Tris-塩酸緩衝液 (pH7.5)、1mM EDTA-Na2、0.05% SDS) で溶出した。溶出液をエタノール沈殿によって濃縮し、ドライアップした後水に溶解し、-80℃で保存した。

【0081】(3) 1本鎖cDNAの合成

190ngのmRNAを65℃、10分間の熱処理を行った後、ただちに氷上で3分間急冷した。このサンプルをテンプレートにして、First-Strand cDNA Synthesis Kit (ファルマシア) を用いて1本鎖cDNAを合成した。合成したcDNAは-20℃で保存した。

【0082】実施例5

RT-PCR法によるN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング先に述べた方法で調製した1本鎖cDNAをテンプレートにした以下の反応液を調製した。この反応液をPeltier Thermal cycler PTC-200 (フナコシ) を用いて、95℃/1分間の反応後、95℃/1分間、45℃/1分間、72℃/2分間を30サイクル反応させる条件でPCRを行い、反応生成物を得た。

テンプレートcDNA: 3μl

10×buffer: 5μl

2.5mM NTP: 8μl

NMT-1: 1μl (50pmol)

20 NotI-(dT) 18: 1μl (50pmol)

H₂O: 31μl

ExTaq (TAKARA): 1μl

実施例6

プラスミドベクターへのサブクローニング

0.8% アガロースゲルを用いてTAE中で実施例5で得た反応生成物の電気泳動を行い、得られた目的生成物のバンドを切り取り、GENE CLEAN (フナコシ) を用いてゲルからDNAを回収した。回収したDNAをpT7blueベクター (Novagen) にライゲーションした後、大腸菌DH5αにトランスフォーメーションした。X-galを用いてカラーセクションを行った後に、アンピシリンを含むLB培地で液体培養を行い、アルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出、単離した。インサートの有無はアガロース電気泳動によって確認した。こうして、N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片を、プラスミド中に単離した。

【0083】実施例7

塩基配列の決定

40 実施例6において単離したプラスミドを用いて下記の反応液中でプライマーエクステンションを行った。反応条件は96℃/1分間反応させた後、96℃/0.2分間、50℃/0.1分間、60℃/4分間を25サイクル行った。反応液に対してエタノール沈殿を行い、得られたDNAをTemplate suppression reagentに溶解し、ABI-310ジェネティックアナライザーを用いて分析した。目的DNAの中央部分の配列を決定するためには、DNAをStyIで処理して得られたDNAフラグメントをpUC19にサブクローニングしたプラスミドを用いた。配列番号:

21

6 及 7 にそれらのプライマー配列を示す。

【0084】プライマーエクステンション反応液の組成
プラスミド DNA (20 ng) : 2 μ l

Premix : 4 μ l

Primer : 1 μ l

H₂O : 3 μ l

実施例 8

5' RACE 法による N-メチルトランスフェラーゼ mRNA の 5' 上流域の単離

5' 上流域の単離には、5' - Full RACE Core Set (TAKARA) を用いた。配列番号 : 8 ~ 17 に使用したプライマーの配列を示す。

【0085】実施例 4 に記した方法で合成した 1st strand cDNA について、hybrid RNA の分解、ライゲーション反応による 1 本鎖 cDNA の環化の後に、配列番号 : 8 ~ 12、または配列番号 : 13 ~ 17 のプライマーを用いて、常法に基づいて PCR 反応を行い、反応生成物を得た。アクリルアミド電気泳動により反応生成物のバンドを分離し、ゲルから DNA を回収し、pT7 blue ベクターにサブクローニングした。その後、実施例 6 と 7 と同様の方法でインサートされた DNA の塩基配列を決定した。

【0086】実施例 9

N-メチルトランスフェラーゼの大腸菌での発現
単離した N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子を発現ベクター pET23d (Novagen) に組み込み直すために以下の操作を行なった。

【0087】実施例 6 で得られた単離 N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子 DNA が挿入されている pT7 blue ベクターをテンプレートとして、配列番号 : 18 及び 19 に記載のプライマーを用いて以下の条件で PCR を行い反応生成物を得た。則ち、反応条件は、95°C / 1.5 分間の後、95°C / 1 分間、52°C / 1 分間、72°C / 1 分間を 30 サイクル行った。

【0088】これとは別に単離 N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子 DNA 断片を NcoI と EcoRI で処理して得られた断片を pET23d ベクターに挿入した。次に、この pET23d ベクターの NcoI サイトに、上記 PCR 産物をさらに挿入し N-メチルトランスフェラーゼ発現プラスミドを構築した。このプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) にトランスフォーメーションした。得られた大腸菌を 37°C で 2 時間培養した後に、IPTG を最終濃度 0.3 mM になるように加え、30°C でさらに 3 時間培養を行った。培養終了後集菌し、3 ml の培養液の菌体に対し 0.2 ml の 10 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、0.1 M NaCl、1 mM EDTA-Na2 中で 1 分間断続的に超音波破碎を行った。これを 14,000 rpm、10 分間の遠心分離を行い、得られた上清を酵素液とした。

【0089】ここで得られた N-メチルトランスフェラ

22

ーゼ遺伝子を含む DNA 断片のヌクレオチド配列は実施例 7 及び 8 の配列決定から、配列番号 : 2 の配列を有するものであり、対応する RNA ヌクレオチド配列は配列番号 : 3 に示される。また、対応する N-メチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列は配列番号 : 1 に示される。

【0090】N-メチルトランスフェラーゼ活性測定のための反応液は、100 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、0.2 mM MgCl₂、0.2 mM パラキサンチン、4 μ M [メチル-¹⁴C] S-アデノシルメチオニン (0.9 kBq) に酵素液 10 μ l を加えたものとし、反応液の体積は 100 μ l とした。27°C で 10 分間の反応を行い、得られた ¹⁴C-カフェインを 1 ml のクロロホルムを加えて抽出し、クロロホルム層の放射活性を測定した。対照としては、反応液にパラキサンチンの代わりにキサントシンを加えたものまたは、反応液からパラキサンチンを除いたものを用いた。活性測定の結果、基質としてパラキサンチンを加えたときのみ 1.56 pmol のカフェインが生成したことが判明した。

【0091】実施例 10

(アンチセンス法によるカフェインの合成の抑制) アンチセンス N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子を有する組換えベクターを以下の方法により構築した。

【0092】実施例 9 で用いた単離 N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子の全長を鋳型とし、配列番号 20 及び 21 に記載の配列を有するプライマーを用いて PCR にて増幅し、得られた DNA 断片の末端を BKL キット (TAKARA 社製) で平滑末端化して平滑末端化 PCR 増幅断片を得た。

【0093】また、ハイグロマイシン耐性遺伝子を連結した pBI ベクター (clontech 社製) を制限酵素 XbaI と SacI で切断して β -グルクロニダーゼ遺伝子を除去し、得られら線状ベクターの末端を平滑末端とした。

【0094】この平滑末端化線状ベクターを上記平滑末端化 PCR 増幅断片とライゲーションキット (TAKARA 社製) を用いて結合させ、得られた反応生成物から pBI 中の CaMV 35S プロモーターの下流に該遺伝子が逆方向で機能し得る位置に挿入されている所望の N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子を有するベクターをシーケンシングにより選択した。このようにして、アンチセンス N-メチルトランスフェラーゼ遺伝子が挿入された所望の組換えベクターを得た。そしてこれを以下の形質転換に用いた。

【0095】コーヒーの組織培養によるカフェイン生成の従来法については、これまでにも Planta, 108, 339 (1972), Plant Cell Reports, 2, 109 (1983) などの多くの報告がある。これらの従来法に従ってコーヒーの茎頂ないし幼葉からカルスを誘導した。得られたカルスに

パーティクルガン法で上記で構築された組換えベクターを導入した。あるいは、該カルスのプロトプラストを調製して、このプロトプラストにエレクトロポレーション法により組換えベクターを導入した。導入後、マーカー耐性を示す細胞を選抜した。選択された細胞は明条件下で培養し、形質転換細胞に対して実施例 9 に記載の方法により酵素活性を測定した。その結果、アンチセンス N-メチルトランスフェラーゼ DNA を導入した細胞におけるカフェインの生産は、アンチセンス N-メチルトランスフェラーゼ DNA を導入していない通常細胞と比較して有意に減少していることが判明した。

【0096】さらに、形質転換したコーヒー培養細胞を再分化させ、幼植物体を得た。再分化の方法は Z. Pfanz enphysiol. Bd., 81, 395 (1977)、Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 8, 243 (1987) を含む文献に記載の従来法に従って行った。幼植物体の葉を用いて実施例 9 に記載の方法により酵素活性を測定した。その結果、アンチセンス N-メチルトランスフェラーゼ DNA を導入*

*した植物体のカフェイン生産は、アンチセンス N-メチルトランスフェラーゼ DNA を導入していない植物体と有意に減少していることが判明した。

【0097】

【発明の効果】本発明によれば、工業用、食品用または医療用酵素として利用できる N-メチルトランスフェラーゼを効率よく生産する事が可能になる。

【0098】本発明によれば、カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変してカフェイン代謝系の化合物を効率よく生産する事が可能になる。

【0099】本発明によれば、カフェイン産生植物、植物組織または植物細胞のカフェイン生合成代謝を改変してカフェイン代謝系の化合物群の生成比を改変することが可能になる。

【0100】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUI CHEMICALS, INC.

<120> Gene Encoding Caffeine Synthesis System Associated Enzyme and Use t hereof

<150> JP 146358/1999

<151> 1999-05-26

<160> 20

<210> 1

<211> 356

<212> PRT

<213> Camellia sinensis

<400> 1

```

Phe Met Asn Arg Gly Glu Gly Glu Ser Ser Tyr Ala Gln Asn Ser Ser
      5              10              15
Phe Thr Gln Gln Val Ala Ser Met Ala Gln Pro Ala Leu Glu Asn Ala
      20              25              30
Val Glu Thr Leu Phe Ser Arg Asp Phe His Leu Gln Ala Leu Asn Ala
      35              40              45
Ala Asp Leu Gly Cys Ala Ala Gly Pro Asn Thr Phe Ala Val Ile Ser
      50              55              60
Thr Ile Lys Arg Met Met Glu Lys Lys Cys Arg Glu Leu Asn Cys Gln
      65              70              75              80
Thr Leu Glu Leu Gln Val Tyr Leu Asn Asp Leu Phe Gly Asn Asp Phe
      85              90              95
Asn Thr Leu Phe Lys Gly Leu Ser Ser Glu Val Ile Gly Asn Lys Cys
      100             105             110
Glu Glu Val Pro Cys Tyr Val Met Gly Val Pro Gly Ser Phe His Gly
      115             120             125
Arg Leu Phe Pro Arg Asn Ser Leu His Leu Val His Ser Ser Tyr Ser
      130             135             140
Val His Trp Leu Thr Gln Ala Pro Lys Gly Leu Thr Ser Arg Glu Gly
      145             150             155             160

```

25

26

Leu Ala Leu Asn Lys Gly Lys Ile Tyr Ile Ser Lys Thr Ser Pro Pro
 165 170 175
 Val Val Arg Glu Ala Tyr Leu Ser Gln Phe His Glu Asp Phe Thr Met
 180 185 190
 Phe Leu Asn Ala Arg Ser Gln Glu Val Val Pro Asn Gly Cys Met Val
 195 200 205
 Leu Ile Leu Arg Gly Arg Gln Cys Ser Asp Pro Ser Asp Met Gln Ser
 210 215 220
 Cys Phe Thr Trp Glu Leu Leu Ala Met Ala Ile Ala Glu Leu Val Ser
 225 230 235 240
 Gln Gly Leu Ile Asp Glu Asp Lys Leu Asp Thr Phe Asn Ile Pro Ser
 245 250 255
 Tyr Phe Ala Ser Leu Glu Glu Val Lys Asp Ile Val Glu Arg Asp Gly
 260 265 270
 Ser Phe Thr Ile Asp His Ile Glu Gly Phe Asp Leu Asp Ser Val Glu
 275 280 285
 Met Gln Glu Asn Asp Lys Trp Val Arg Gly Glu Lys Phe Thr Lys Val
 290 295 300
 Val Arg Ala Phe Thr Glu Pro Ile Ile Ser Asn Gln Phe Gly Pro Glu
 305 310 315 320
 Ile Met Asp Lys Leu Tyr Asp Lys Phe Thr His Ile Val Val Ser Asp
 325 330 335
 Leu Glu Ala Lys Leu Pro Lys Thr Thr Ser Ile Ile Leu Val Leu Ser
 340 345 350
 Lys Ile Asp Gly
 355

<210> 2

<211> 1427

<212> DNA

<213> Camellia sinensis

<400> 2

tqatatcact gctgtgqcaq ctgqccctctt tqctataaaa attacttttc tqacqagqca 60
 tggagctagc tactgcqggg aaggtgaacg aagtgttqtt catgaacagq ggggaaggga 120
 aaagtatgta tqcacaaaac tcttctttca cqacaacaqt qccctcaatq qcacaqccaq 180
 cgctagaaaa tqcaqttgaa actctcttct ccagaqattt ccaccttcaa gctcttaacq 240
 caqcgqactt qggttqtgca qcqggtccaa acacattcgc aqtqatttct acgatcaaga 300
 qaatgatqga aaagaatatc aqggaattga attqccaaac actqqaactt caqgtttact 360
 tgaatgatct ttttggaaat gatttcaata cctcttcaa aggcctgtc tctgaggtta 420
 ttqtaacaa atgtgaqgaa qttccqtqtt atgtgatqgq aqtaccqgqg tctttccatq 480
 gccqgctttt tctcgtaac agcttacatt tagttcattc ctcttacagt gttcattgqc 540
 ttactcaqgc accaaaaqga ctcacaagca qagaagqctt qgcattaaac aaqggaaga 600
 ttacatatac aaagacaagc cctcctgttg taagagaagc ctacttatct caatttcataq 660
 aagatttcac aatgtttctc aatgctagat cccaagaagt qgttccaaat qgttqtatqg 720
 tgttgatact tctgtgtagg caatgttctg atccttcaga catgcagagc tgctttactt 780
 qggactatt agctatqgcc attgctgaat tqgtttcaca gggattgata gatgaagata 840
 aattagacac cttcaatata ccagctatt ttgcatcact tqaggaagtq aaagatataq 900
 tqgagagqga cggatcattc acaattgatc atatagaagg qtttgatctt gatagcgtatq 960
 aaatqcaqga gaatgataaa tqggttagag qggaagaaqt tacciaaqt qtcaggcct 1020
 tcacagagcc tataatttca aaccagtttg qacctgaaat catggacaaa ctatatgaca 1080
 aattcactca catttgaatt tcagatttqg aaqcaaaqct accgaagacc acaagtatca 1140

27

28

tcctaqtqct ttccaagatt qatqgataqt tttttaqtqt tqtgaataa actqttqtcc 1200
 ctatcacata tatgccacta gagqgtttgt ccaatgtatt gcacaagaag atttgagagq 1260
 qgtcaaatat aaaaagcatt ttgctcttqt qtqgagagq aatgttttct tgatttaaat 1320
 ctgtgatacc caaatcgtaa tqtgqgaag aaatgagaag ttgaacatga aattttaaaa 1380
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaatt cctgcqgccq cqaattc 1427

<210> 3

<211> 1427

<212> RNA

<213> Camellia sinensis

<400> 3

ugauaucacu gcugugqcaq cuggccucuu ugcuauaaaa auuacuuuuc ugacgagqca 60
 uggagcuagc uacugcqqgq aagqugaacq aaquuuuuu cauqaacaq qgggaaggag 120
 aaauaguuu ugacaaaaac ucucuuuua cgcaacaagu ggcucuaug gcacagccaq 180
 cqcuaqaaa ugcaquuaa acucucuuu ccagagauuu ccaccucaa gcucuuuacq 240
 caqcqqacuu gqquuqca qcqquccaa acacauucqc aquauuuu acqaucaaga 300
 gaauqauqga aaagaaauqc aqggaauuqa auugccaaac acugqaacuu cagguuuacu 360
 ugaauqauu uuuuqgaau qauuucaaua ccucuucaa aqgcuuucq ucugagguua 420
 uugquaaca auugagqga guuccquuu auquauugq aquaccqggq ucuuuccauq 480
 gccqgcuuu uccucquaac aqcuuacuu uaguucuuu cucuuacaqu quucuuuqc 540
 uuacucagqc accaaaagga cucacaagca gagaagqcuu ggcuuuaac aaggggaaga 600
 uuacauauc aaagacaagc ccuccquuq uaagagaaqc cuacuuacu caauuucauq 660
 aagauuucac aauguuucuc aaugcuagau cccaagaqgu gquuccaaau gquuquauqg 720
 uguugauacu ucququagq caauquucug auccuucaga cauqcaqac ucuuuuacu 780

gggaacuauu agcuauqgcc auuqcuqau ugquuucaca gqgaauqaua qauqaagaua 840
 aaauagacac cuucaauuaa ccagcuauu uuqcaucacu uqaggaagug aaqauauaq 900
 uqgaqagqga cgaucuuuc acaauqauc auauagagq quuuqaucuu qauagcqua 960
 aaauqcaqga qauqauaaa uqquuagag qggaauuuu uaccaagquu qucagqgccu 1020
 ucacagagcc uauaauuua aaccaguuuq gaccugaaau cauqgacaa cuauaugaca 1080
 aaucacuca cauquauu ucagauuuq aaqcaaaqc accqaaqacc acaquauca 1140
 uccuagugcu uuccaagauu qauqgaaqu uuuuagugu uguqaaaua acuguuuucc 1200
 cuaucacua uauqccacua qagqguuqu ccauquauu qcacaagaag auuqagaqg 1260
 ggucaauau agaaagcauu uugcucuuu quqgagagq aaquuuuuu ugauuuuuuu 1320
 cuquauuacc caauucuaa uguuqgaag aaauqagaag uuqaacauqa auuuuuuuuu 1380
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaauu ccuqcqgccq cqaauuc 1427

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Camellia sinensis

<400> 4

Phe Met Asn Arg Gly Glu Xaa Glu Ser Ser Tyr Ala Gln Asn Ser Gln

5

10

15

Phe Thr Gln Val

20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<400> 5

ttYatgaaYM gIggIgaRg 19

<210> 6

29
<211> 19
<212> DNA
<400> 6
caaaagggtc agtgctqca 19
<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<400> 7
atgaccatga ttacgcc 17
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<400> 8
gccqgtacct ttctggggcc 20
<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<400> 9
ccgctgcgtt aagaqcttga ag 22
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<400> 10
gccaaacact ggaacttcaq g 21
<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<400> 11
ccattgaggg cacttggtgc gtg 23
<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<400> 12
ggcctgtcgt ctgaqgttat tq 22
<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<400> 13
caqcaatggc cataqctaataq 22
<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<400> 14
ccgctgcgtt aagaqcttga ag 22
<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<400> 15
gccaaacact ggaacttcaq g 21
<210> 16

31

32

<211> 23
 <212> DNA
 <400> 16
 ccattgaggc cacttggtgc qtg 23
 <210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <400> 17
 ggcctgtcgt ctgaagttat tg 22
 <210> 18
 <211> 17
 <212> DNA
 <400> 18
 gccatggttt acgcaca 17
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <400> 19
 cggccatgga aaqaccccga 20
 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <400> 20
 tgatatcact gctgtggcaq c 21
 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <400> 21
 aaaatttcac gttcaacttc t 21

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	9/10
	9/10	C 1 2 P	17/18
C 1 2 P	17/18		23/00
	23/00	C 1 2 N	5/00
//(C 1 2 N	1/21		A
C 1 2 R	1:19)		C
(C 1 2 N	5/10		
C 1 2 R	1:91)		